



Régulation de la fonction cardio-respiratoire au cours du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri* : rôle de la température

Marie Durollet

► To cite this version:

Marie Durollet. Régulation de la fonction cardio-respiratoire au cours du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri* : rôle de la température. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2015. Français. NNT : 2015LAROS037 . tel-01373440

HAL Id: tel-01373440

<https://theses.hal.science/tel-01373440>

Submitted on 28 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE



ÉCOLE DOCTORALE Gay Lussac

UMR7266 Littoral, Environnement et Sociétés

THÈSE présentée par :

Marie Durollet

Soutenance le 18 décembre 2015

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions

<p>Régulation de la fonction cardio-respiratoire au cours du cycle de vie de <i>Nothobranchius furzeri</i> : rôle de la température</p>
--

JURY :

Yann Voituron

Professeur, Université de Lyon 1, Rapporteur

David McKenzie

Directeur de recherche CNRS, Université de Montpellier, Rapporteur

Patrick Prunet

Directeur de recherche INRA, Université de Rennes, Examineur

Michael Rera

Chargé de Recherche CNRS, Université Paris-Diderot, Examineur

Christel Lefrançois

Maître de conférences, Université de La Rochelle Directrice de thèse

Nathalie Imbert

Maître de conférences, Université de La Rochelle Directrice de thèse

AVANT-PROPOS

Cette thèse était accueillie au laboratoire LIENSs (Littoral, Environnement et Sociétés, UMR 7266), dépendant de l'Université de La Rochelle et du CNRS. Ce travail s'inscrivait au sein du projet ALIVE ("Ageing and functional integrity: modulation by LIfe-extending treatments in a VERtebrate model with extremely short lifespan"), dont l'objectif était d'étudier, chez un vertébré soumis à deux traitements antvieillessement différents (*i.e.* restriction calorique et réduction de la température), les variations de trois fonctions biologiques clés au cours du vieillissement : la fonction immunologique, les performances moteurs et sensorielles et la fonction cardio-respiratoire. Réaliser cette thèse dans le cadre d'un projet a permis de multiplier les collaborations avec l'ensemble des partenaires qui participait à ce travail. Lors de ces trois années de doctorat, j'ai également eu l'opportunité d'encadrer des stagiaires en deuxième année de licence (Cheïma Barhoumi), en première année de master (Pierre Laille, Thibaut Charmoille, Adrien Inacio), ainsi qu'une étudiante en Diplôme Universitaire (Alicia Schouman). Des collaborations scientifiques ont été établies avec Mario Baumgart & Alessandro Cellerino du Jena Centre for Systems Biology of Ageing (Allemagne), et avec Morten Bo S. Svendsen du département de biologie de l'Université de Copenhague (Danemark). De plus, j'ai eu l'occasion de réaliser des communications scientifiques sur les résultats de ce travail de recherche au cours de congrès nationaux (« Congrès d'écophysiologie animale », 2013), ainsi internationaux (« International Congress of the Biology of Fish », 2014 ; « From bush to bench: 10 years of *Nothobranchius furzeri* as a model system in Biology », 2014 ; « Annual congress of the Society of Experimental Biology » ; 2013, 2012). Il m'a également été possible de partager ses résultats auprès du grand public au

travers de différentes actions de communications (Journée mondiale de l'Océan, Fête de la science, Rencontres CNRS Jeunes 'Sciences et Citoyens').

Ce travail de recherche est le résultat d'un travail d'équipe. Je souhaite ainsi remercier toutes les personnes qui y ont contribué :

Je tiens tout d'abord à adresser toute ma reconnaissance aux Membres du Jury qui ont accepté de juger ce travail : les rapporteurs Messieurs Yann Voituron et David McKenzie, ainsi que les examinateurs Messieurs Patrick Prunet et Mickael Rera.

Mes plus vifs remerciements s'adressent également à Christel Lefrançois et Nathalie Imbert-Auvray, pour l'encadrement scientifique de cette thèse. Elles ont rendu ce travail possible par leur aide, leurs conseils précieux, leur disponibilité, ainsi que la grande confiance qu'elles m'ont accordé. J'exprime également ma gratitude envers le l'UMR LIENSs (littoral, environnement et sociétés ; UMR 7266), et à son directeur, Monsieur Olivier De Viron, et anciens directeurs Paco Bustamante et Pierre Richard pour leur accueil durant cette thèse. De plus, cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien financier de l'ANR et du ministère de la recherche. Je tiens à remercier l'ensemble des stagiaires qui ont permis grâce aux stagiaires qui se sont investis dans ce travail : Cheïma Barhoumi, Pierre Laille, Alicia Schouman, Thibaut Charmoille, Adrien Inacio, Léa Kayser. Merci à toutes les personnes qui ont participé au projet ALIVE, merci également au personnel technique du laboratoire LIENSs, Michel Prineau, Valérie Huet, et Martine Breret pour l'aide qu'ils m'ont apporté. Je voudrais remercier tous les intervenants de mon comité de thèse qui m'ont guidé tout au long de ce travail, Paolo Domenici, Alessandro Cellerino, Patrick Bois et Ingrid Fruitier. Un grand merci à Manu pour tout d'abord son grand talent de soigneur auprès des furzeri et compagnie, mais aussi pour

son soutien et son amitié. Merci à toutes les âmes charitables qui ont participé à la relecture de ce manuscrit (j'espère n'oublier personne !) : Etienne, Manu, Thomas Miloskevitch, Julie, Chloé, Marie Vanier, Thomas Lacouë, Jérôme et Anne. Un énorme merci à Alma, qui a su prendre soin (voire chouchouter) sa colloc' dans ces moments de bas que tout thésard rencontre en fin de parcours ! Mais aussi d'avoir toujours été présente dans les moments de haut ! Merci aux copains (Nantais, Rochelais et d'autres horizons) d'avoir permis des moments d'évasions rapides et efficaces. Merci Etienne pour ton soutien et ta compréhension sans limite. Merci mes chers parents d'avoir toujours été à mes côtés pour m'écouter, m'encourager et me supporter !

SOMMAIRE

Avant-propos	3
Liste des abréviations	13
Liste des figures	17
Liste des tables.....	26
Introduction générale	28
Chapitre 1 : État de l’art	36
1.1 Vieillessement	38
1.1.1 Quelques théories liées au processus de vieillissement	40
1.1.2 Métabolisme & longévité	43
1.1.3 Etude du métabolisme	44
1.1.4 Bioénergétique	45
1.1.5 Les différents taux métaboliques	46
1.1.6 Effet de la température sur l’AMS	49
1.2 Système cardio-vasculaire	50
1.2.1 Anatomie du cœur	51
1.2.2 Battement cardiaque.....	53
1.2.3 Cardiomyocytes	55
1.2.4 Couplage excitation-contraction.....	57
1.2.5 Vieillessement & performances cardiaques	60
1.2.6 Température & performances cardiaques.....	61
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes.....	65

2.1	Le modèle biologique étudié, <i>Nothobranchius furzeri</i>	67
2.1	Elevage des poissons.....	69
2.2	Caractérisation des performances cardiaques	74
2.2.1	Dissociation des cardiomyocytes.....	74
2.2.2	Etude des flux de calcium au sein des cardiomyocytes lors du ECC	76
2.3	Mesure du métabolisme énergétique	78
2.3.1	Détermination du MMR.....	79
2.3.2	Détermination du SMR	80
2.3.3	Détermination de l'AS.....	80
2.3.4	Mesure du taux relatif à la SDA.....	80
2.3.5	Mesure des performances de nage aérobic	82
 Chapitre 3 : Capacité métabolique au cours de la vie de <i>Nothobranchius furzeri</i> : rôle régulateur de la température		
	Préambule	87
3.1	Introduction	91
3.2	Material and methods	92
3.3	Results	95
3.4	Discussion	97
3.5	Conclusion.....	99
	Synthèse.....	101
 Chapitre 4 : Niveaux d'Activités, Vieillesse et Variabilité inter-individuelle. 103		
	Préambule	105
 Chapitre 4 - Partie 1 : Temperature and activity level in aging <i>Nothobranchius furzeri</i>..... 109		
4.1	Introduction	113
4.2	Materials and Methods	116
4.2.1	Fish.....	116

4.2.2	Experimental protocol	117
4.2.3	Statistical analysis	125
4.3	Results	126
4.3.1	Growth and reproduction in groups	126
4.3.2	Growth in individual	127
4.3.3	Metabolism in individual	127
4.3.4	Reproduction in individual	129
4.3.5	Correlations between activity levels, metabolic response & lifespan in individual.	132
4.4	Discussion	133
Chapitre 4 - Partie 2 : Digestion et locomotion au cours du vieillissement chez		
<i>Nothobranchius furzeri</i> : effet régulateur de la température		143
4.5	Introduction	146
4.6	Matériels et Méthodes.....	150
4.6.1	Matériel biologique	150
4.6.2	Prise alimentaire spontanée	151
4.6.3	Analyse des fèces.....	152
4.6.4	Caractérisation de la SDA	153
4.6.5	Locomotion	156
4.6.6	Statistique	160
4.7	Résultats.....	160
4.7.1	Prise alimentaire et fèces.....	160
4.7.2	Caractérisation de la SDA	161
4.7.3	Locomotion	163
4.8	Discussion	165
Synthèse.....		173
Chapitre 5 : Régulation du fonctionnement cardiaque au cours du cycle de vie de		
<i>Nothobranchius furzeri</i> acclimatÉ à deux températures		175

Préambule	177
5.1 Introduction	183
5.2 Materials and Methods	185
5.2.1 Fish	185
5.2.2 Experimental protocol: Calcium handling study	185
5.2.3 Experimental protocol: functional genomic approach.....	190
5.2.4 Statistical analysis	191
5.3 Results	192
5.3.1 Morphological modifications	192
5.3.2 Genomic approach.....	195
5.3.3 Functional modifications for ECC.....	196
5.4 Discussion	198
5.4.1 Morphological modification	198
5.4.2 Functional modification	201
Synthèse	205
Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives	207
6.1.1 Système cardio-respiratoire au cours de la vie de <i>Nothobranchius furzeri</i>	210
6.1.1 Rôle régulateur de la température.....	217
6.1.2 Conclusions et perspectives.....	220
Références bibliographiques	225
Annexes	268

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

Age_{opt} : Age métabolique optimal

AMR : « Active metabolic rate », taux métabolique actif

ANEPPS : 4-[2-[6-(Dioctylamino)-2-naphthalenyl]ethenyl]-1-(3-sulfopropyl)-pyridinium
« voltage-sensitive dye », sonde sensible au potentiel

ATP : Adénosine triphosphate

projet ALIVE : « Ageing and functional integrity: modulation by LIfe-extending treatments in a VErtibrate model with extremely short lifespan », Vieillissement et intégrité fonctionnelle : modulation par traitements anti-âge chez un Vertébré à durée de vie extrêmement courte.

Ca²⁺ : Calcium

CICR : « Calcium Induced - Calcium release », libération de calcium induite par le calcium

CO₂ : Dioxyde de carbone

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DMSO : Dimethyl sulfoxide

ECC : « Excitation-contraction coupling », couplage excitation-contraction

ES : Erreur standard

F : Pourcentage d'œufs fertilisés par individu

FLUO4-AM : marqueur fluorescent indicateur du calcium, acétoxyméthyl ester

LIENSs : Littoral, Environnement & Sociétés

MI : « Percentage of mating interactions », pourcentage des interactions entre mâle & femelle

MMR : « Maximal Metabolic Rate », taux métabolique maximal

MO₂ : Consommation d'oxygène

Mo_{2max} : Consommation d'oxygène maximale obtenue lors d'un test de nage

MS-222 : Tricaine mesylate

MZM 0410 : Souche provenant d'œufs récoltés au Mozambique en avril 2010

NCX : Echangeur sodium/calcium

n_w : « Number of eggs per female per day », nombre d'oeufs pondus par femelles par jour

\emptyset : « Eggs diameter », diamètre des œufs

O_2 : Dioxygène

PAs : Potentiel d'action spontanée

PBS : Phosphate-buffered saline solution

PMCA : « Plasma membrane Ca^{2+} ATPase », Pompe Ca^{2+} - ATPase du sarcolemme

RMR : Routine Metabolic Rate, taux métabolique de routine

ROS : Reactive oxygen species , dérivés réactifs de l'oxygène

RyR : Canal calcique ligand-dépendant, sensible à la ryanodine

SDA : Action Spécifique Dynamique

SE : « Standard error », erreur standard

SERCA : « sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATPase » Pompe ATPase calcique du reticulum sarcoplasmique

SGR : « Sustainable growth rate », taux de croissance

SR : « sarcoplasmic reticulum », réticulum sarcoplasmique

U_{crit} : Vitesse de nage maximale

U_{routine} : Vitesse de nage de routine

ω_{w1} : « Initial mean body weight », poids initial moyen

ω_{w2} : « Final mean body weight », poids final moyen

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure I. 1 Représentation schématique des différents taux métaboliques en fonction du temps et de la variation associée du niveau d'activité : SMR (taux métabolique standard), MMR (taux métabolique maximal), RMR (taux métabolique de routine). L'AS (capacité métabolique) correspond à la différence entre MMR et SMR, et représente l'énergie totale dont dispose l'organisme pour réaliser l'ensemble de ses activités.47

Figure I. 2 Schéma de l'anatomie du cœur de poisson. Les flèches représentent le sens de circulation du sang au travers des différentes chambres du cœur, l'atrium et le ventricule (modifié d'après *anatomybodyblog.com*)52

Figure I. 3 Cardiomyocyte de *Nothobranchius furzeri* marqué avec une sonde DAPI-Phalloïdine. Le DAPI marque le noyau (bleu) et la phalloïdine-FITC s'associe à l'actine et marque ainsi les membranes (vert). Le cardiomyocyte de *N. furzeri* est de forme longiligne, et mononucléé. (photographie réalisée au cours de ce travail de thèse, et présentée dans le cadre du Chapitre 5)55

Figure I. 4 Représentation schématique d'un cardiomyocyte. SR : réticulum sarcoplasmique ; ATP : pompes calciques chargées (i) d'expulser le calcium à l'extérieur du cardiomyocytes (on parle alors de pompe ATPase calcique du sarcolemme, ou PCMA pour « plasma membrane Ca^{2+} ATPase » en anglais ; ou (ii) de pomper le calcium du cytosol vers le réticulum sarcoplasmique (on parle alors de la pompe ATPase calcique du SR ou SERCA id) ; NCX : échangeur sodium/calcium (entrée ou sortie de calcium de la cellule) ; RyR : canal calcique ligand-dépendant, sensible à la ryanodine. Les canaux ioniques (voltage-dépendants sur le sarcolemme ou ligand-dépendants sur la membrane du RS) représentés en bleu permettent l'augmentation de calcium intracellulaire, induisant la contraction des myofilaments ; les pompes ou échangeurs ioniques

représentés en rouge/orangé permettent la diminution du calcium intracellulaire, donc la relaxation des myofilaments.58

Chapitre 2

Figure II. 1 Cycle de vie de *Nothobranchius furzeri* d'après Cellerino *et al.*, 2015.68

Figure II. 2 (A) Mâle et (B) femelle *Nothobranchius furzeri*. Crédit photo : Thierry Guyot69

Figure II. 3 Colonne d'élevage comprenant un bac de filtration et 12 aquariums de 30 L avec chacun un pondoir.70

Figure II. 4 (A) Œuf non fécondé ; (B) Œuf fécondé caractérisé par une double membrane, et (C) Œuf contenant un embryon de *Nothobranchius furzeri* prêt à éclore. Crédit photo : Thierry Guyot72

Figure II. 5 Représentation schématique du protocole de dissociation des cardiomyocytes du cœur de *Nothobranchius furzeri*.75

Figure II. 6 Exemple d'une réponse calcique suite à la dépolarisation de la membrane d'un cardiomyocyte marqué au FLUO chez *Nothobranchius furzeri*. Les différentes variables qui ont été estimées sont 1) l'amplitude du calcium impliqué dans la contraction du cardiomyocyte, 2) la cinétique de l'entrée de calcium, et 3) la cinétique de la sortie de calcium.78

Figure II. 7 Exemple de consommation d'oxygène d'un individu *Nothobranchius furzeri* ($\text{mg O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ayant été préalablement chassé jusqu'à épuisement, puis placé dans un respiromètre à flux intermittent pendant 36 h. La donnée correspondant au taux métabolique maximal (MMR) est entourée en vert. Les données utilisées pour calculer le taux métabolique standard (SMR) sont entourées en violet. L'histogramme de fréquence de l'ensemble de ces données suivent une distribution bimodale, dont est issue la valeur de SMR (barre violette), ainsi qu'un ensemble de valeurs correspondant au métabolisme de routine (RMR ; barres grises).79

Figure II. 8 Respiromètre à flux intermittent modifié afin de permettre l'alimentation des poissons. Un bouchon en silicone amovible permet d'y introduire les chironomes, tout en gardant l'étanchéité du respiromètre une fois fermé. Une grille positionnée à 2 cm au fond des respiromètres permettait d'isoler les vers non ingérés des poissons.81

Figure II. 9 Analyse graphique de la SDA. La magnitude de la SDA est représentée en rose-orangé. Le $MO_{2\text{ max}}$ représente la valeur maximale de MO_2 atteinte durant la SDA, à laquelle est soustraite la valeur de SMR (représentée par un trait violet). La SDA est également caractérisée par sa durée et par le temps entre la prise de nourriture et la $MO_{2\text{ max}}$. Les points bleus représentent les moments où le poisson était en SMR. Les bandes verticales grises correspondent aux nuits et les blanches aux journées.82

Figure II. 10 Tunnel de nage permettant d'enregistrer la MO_2 et la vitesse de nage critique au cours d'un test de nage.83

Figure II. 11 Exemple de la consommation d'oxygène en fonction de la vitesse de nage. La consommation d'oxygène augmente avec la vitesse de nage jusqu'à atteindre une valeur maximale $MO_{2\text{ max}}$ quand le poisson atteint sa vitesse de nage critique (U_{crit} ; en longueur corporelle par seconde ou $BL.s^{-1}$).....84

Chapitre 3

Figure III. 1 (A) *Nothobranchius furzeri* survival depends on age in individuals acclimated to the two experimental temperatures (26°C: N = 102; 22°C: N = 85, sex-ratio \approx 1:1). Ages at which median survival is reached (i.e. at which 50% of mortality occurred) are indicated by dotted lines. **(B)** Aerobic scope (AS, mean \pm SE) of *Nothobranchius furzeri* (26°C: N = 86; 22°C: N = 80, sex-ratio = 1:1) as a function of age at the two experimental temperatures. Polynomial regressions are represented by curves with equations: (1) for 22°C: $AS = -0.0004 \cdot \text{age}^2 + 0.0203 \cdot \text{age} + 0.0579$ (regression p-value = 0.666×10^{-3}); (2) for 26°C: $AS = -0.0008 \cdot \text{age}^2 + 0.0327 \cdot \text{age} + 0.3244$ (regression p-value = 0.485×10^{-2}). Solid lines correspond to these equations plotted over the range of the ages tested; dotted lines represent expected AS on extrapolated ages. Ageopt was determined based on the derivative $\partial y / \partial x$ of the equation, which equals zero when y attains its maximum. Age_{crit} corresponds to the age at which AS equals to zero. Ageopt

estimated by these models was 25.2 weeks for the 22°C-acclimated fish, while it was 32 % lower for the 26°C-acclimated fish; i.e. 19 weeks. Regarding Agecrit, a difference of 12 % was observed; Agecrit was 49 weeks and 53.4 weeks at 22 and 26°C, respectively..
 Erreur ! Signet non défini.3

Figure III 2. (A) Maximum metabolic rates (MMR, mean \pm SE) and **(B)** Standard metabolic rates (SMR, mean \pm SE) of *Nothobranchius furzeri* as a function of age at the two experimental temperatures, 22°C and 26°C.. **Erreur ! Signet non défini.**

Chapitre 4

Figure IV. 1 Experimental set-up to film one couple, containing an aquarium with a nest full of sand, a monochrome camera connected to a computer, 2 infrared lights to shoot at night, and one filament lamp to shoot at day. **124**

Figure IV. 2 (A) Specific Growth Rates (SGR; mean \pm SE), and **(B)** Eggs production.female⁻¹.day⁻¹ (n_w ; mean \pm SE), depending on age in *Nothobranchius furzeri* acclimatized at two experimental temperatures, 22 and 26 °C. A total of 187 individuals were used to measure SGR (22 °C: N_{tot} = 85, 26 °C: N_{tot} = 102; sex-ratio \approx 1:1). n_w was followed on a total of 67 females (22 °C: N_{tot} = 41; 26 °C: N_{tot} = 56). * symbolizes a significant difference due to age, and + represents a significant impact of temperature. No combined effect was revealed. **126**

Figure IV. 3 Aerobic Scope (AS) of *Nothobranchius furzeri* as a function of age, at the two experimental temperatures. For each target age and temperature, there were as many females as males that were tested, with at 26 °C: N_{tot} = 24 and 8 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively; and at 22 °C: N_{tot} = 26 and 8 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively. Mean (\pm SE) assessed on all the tested fish are represented by histogram bars, and each individual that was tested at both experimented-age are represented by two dots (i.e. one for each tested-ages) connected by a dotted line. * symbolizes a significant difference due to age, showed by a two-way ANOVA (p-value < 0.05). No temperature neither combined effect was found. **128**

Figure IV. 4 (A) Eggs production.female⁻¹.day⁻¹ (n_w), (B) Eggs diameter in mm (Ø), (C) Percentage of fertilized eggs.male⁻¹ (F; 22 °C: N_{couples} = N_{females} = N_{males} = 16 and 7, in 14 to 20 weeks-old individuals and in 30 to 34 week-olds individuals, respectively; 26 °C: N_{couples} = N_{females} = N_{males} = 14 and 9, in 14 to 20 weeks-old individuals and in 30 to 34 weeks-old individuals, respectively), and (D) Percentage of mating interactions between male and female of a couple (MI; mean ± SE); during 28 experimental hours, depending on age in couples of *Nothobranchius furzeri* acclimatized at two experimental temperatures (22 °C: N_{couple} = 13 and 4 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively; 26 °C: N_{couple} = 14 and 4 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively). Mean (± SE) assessed on all the tested fish are represented by histogram bars, and each individual that were tested at both experimented-age are represented by two dots (*i.e.* one for each tested-ages) connected by a dotted line. * symbolizes a significant difference due to age, + represents a significant impact of temperature, and # illustrate a significant combined effect of age and temperature different, showed by a two-way ANOVA (p-value < 0.05). 130

Figure IV. 5 A) Prise alimentaire (moyenne ± ES), et B) Composition énergétique des fèces (moyenne ± ES) en fonction de l'âge chez des couples de *Nothobranchius furzeri* acclimatés à 22 et 26 °C (22 °C : N_{couple} = 16 et 7 respectivement chez les individus âgés de 14 à 18 semaines, puis de 30 à 34 semaines ; 26 °C : N_{couple} = 14 et 9 respectivement chez les individus âgés de 14 à 18 semaines, puis de 30 à 34 semaines). + représente un effet significatif de la température ; * symbolise un effet significatif de l'âge sur la prise alimentaire (ANOVA deux facteurs, p-value < 0,05). Aucun effet combiné entre ces deux facteurs n'a été observé. 161

Figure IV. 6 A) Action spécifique dynamique (SDA ; moyenne ± ES), B) Consommation maximale d'oxygène au cours de la digestion (MO₂ pic ; moyenne ± ES), C) Durée de la SDA (moyenne ± ES), et D) Temps entre la prise alimentaire et la MO₂ pic au cours de la SDA (Temps au Pic de SDA ; moyenne ± ES) en fonction de l'âge chez des couples de *Nothobranchius furzeri* acclimatés à 22 et 26 °C (22 °C : N_{tot} = 12 et 6 chez des individus âgés respectivement de 20 puis 36 semaines ; 26 °C : N_{tot} = 10 et 6 chez des individus âgés respectivement de 20 puis 36 semaines). + et * représentent respectivement l'effet significatif de la température et de l'âge sur la SDA ; # représente la présence d'un effet combiné de l'âge et de la température, mis en évidence par une ANOVA deux facteurs (p-value < 0,05). 162

Figure IV. 7 **A)** Vitesse de nage critique (U_{crit} ; moyenne \pm ES), **B)** Consommation maximale d'oxygène mesurée lors du test de nage (MO_{2max} ; moyenne \pm ES), et **C)** Vitesse de nage spontanée ($U_{routine}$; moyenne \pm ES) en fonction de l'âge chez des *Nothobranchius furzeri* acclimatés à deux températures différentes, 22 et 26 °C (22 °C : N_{tot} = 12 et 6 chez des individus âgés de 20 puis 36 semaines ; 26 °C : N_{tot} = 10 and 6 chez des individus âgés de 20 puis 36 semaines). + représente l'effet significatif de la température ; * symbolise l'effet significatif de l'âge sur la prise alimentaire, mis en évidence par une ANOVA deux facteurs (p-value < 0,05). **164**

Chapitre 5

Figure V. 1 Images of cardiomyocytes stained with **A)** DAPI-phalloidin, and **B)** ANEPPS. DAPI staining shows cell nuclei (blue); phalloidin shows the presence of actin (green). ANEPPS is a voltage-sensitive dye who only marks cells membranes. Cells were isolated in 7 weeks-old *Nothobranchius furzeri* acclimatized at 26 °C. **192**

Figure V. 2A) Relative gene expression in *Nothobranchius furzeri* acclimatized at 26°C and **B)** Relative gene expression in *Nothobranchius furzeri* acclimatized at 22°C; 18 and 36 weeks-old fish are compared to control fish of 7 weeks-old. **195**

Figure V. 3 (A) Relative amplitude (mean, \pm SE), and **(B)** Kinetics enhance (mean, \pm SE) characterizing the cardiomyocytes calcium flux allowing cells contraction in aging *Nothobranchius furzeri* exposed at two different temperature, 22 °C and 26 °C. No significant effect of age nor temperature was observed on the relative amplitude. Symbols indicate the significant differences between each tested conditions and # represents the combined effect of age and temperature, resulting from two-way ANOVA (p-value < 0.05). **196**

Figure V. 4 Kinetics decay (mean, \pm SE) characterizing the cardiomyocytes calcium flux allowing cells relaxation in aging *Nothobranchius furzeri* exposed at two different temperatures, 22 °C and 26 °C. Letters symbolize the significant differences between each tested conditions and # represent the combined effect of age and temperature, resulting from two-way ANOVA (p-value < 0.05). **197**

Chapitre 6

Figure VI. 1 Ratios d'expression de gènes ciblés dans les muscles de *N. furzeri*. Ces ratios correspondent à une expression relative par rapport à une condition de référence (i.e. 7 semaine) et ont été normalisées par l'expression du gène *stox2*. La figure **A** représentent les résultats obtenus chez les individus acclimatés à 26 °C et la figure **B** représente les résultats obtenus chez les poissons acclimatés à 22 °C. Avec le gène *cs* codant pour la citrate synthase (CS), enzyme localisée dans la matrice mitochondriale et intervenant dès le début du cycle de Krebs; le gène *sirt1* codant pour la sirtuine 1 (SIRT1), enzyme impliquée dans de nombreux processus, comme les mécanismes anti-inflammatoires, la biogénèse des mitochondries, la résistance au stress ou encore la sénescence cellulaire; le gène *pgc1a* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), codant pour un co-activateur transcriptionnel impliqué dans la biogénèse des mitochondries; le gène *tfam* codant pour le facteur transcriptionnel mitochondrial A (TFAM), activateur clé de la transcription mitochondriale. Ces données ont été obtenues avec le logiciel REST version 2 (Pfaffl *et al.* 2002). Un test t sur les données prises deux à deux avec 10000 permutations a été réalisé afin d'évaluer la significativité des résultats ($p < 0,05$).**212**

Figure VI. 2 Effet de l'âge et de la température sur l'activité spécifique citrate synthase des muscles de *Nothobranchius furzeri*. Chaque barre d'histogramme représente l'activité spécifique moyenne de la citrate synthase \pm SEM (UI/ mgprotéine) dans les muscles des individus acclimatés à 26°C (histogrammes rouges) et à 22°C (histogrammes bleus). Les manipulations sont effectuées en n=21 à 72 répliques totaux (7 à 24 répliques biologiques dosés en triplicatas). Avec S : semaines ; ASCS: Activité Spécifique moyenne de la Citrate Synthase (UI/mgprotéine). L'analyse statistique réalisée avec Prism (GraphPad version 5, 2007) pour étudier les différents âges à chaque température utilise le test de Kruskal-Wallis et un post-test de Dunn. L'analyse statistique réalisée avec Prism (GraphPad version 5, 2007) pour comparer deux températures d'élevage à chaque âge utilise le test de Student. *** pour $p < 0,001$, ** pour $0,001 < p < 0,01$, * pour $0,01 < p < 0,05$ et pas d'indication particulière si $p > 0,05$**213**

LISTE DES TABLES

Chapitre 4

Table IV. 1 Chronology of the experiment for all the measured variables depending of the fish-ages: growth and reproduction in groups; AS, MMR and SMR in individuals, growth in individual. Reproduction was assessed through a set of variables: n_w for eggs production, \emptyset for eggs diameter, F for percentage of fertilized eggs in individuals, MI for percentage of mating interactions in couples ★ represent target ages where measurement of the corresponding variable was realized. ■ symbolized the target periods during which the corresponding variable was monitored. 117

Table IV. 2 Maximum Metabolic Rate (MMR, mean \pm SE), and Standard Metabolic Rate (SMR, mean \pm SE) of *Nothobranchius furzeri* as a function of age, at the two experimental temperatures. For each target age and temperature, there were as many females as males that were tested, with at 26 °C: $N_{tot} = 24$ and 8 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively; and at 22 °C: $N_{tot} = 26$ and 8 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively. 129

Table IV. 3 Correlations between the measured variables (*i.e.* AS for aerobic scope, MMR for maximum metabolic rate, SMR for standard metabolic rate, SGR for sustainable growth rate, n_w for eggs production, \emptyset for eggs diameter, F for percentage of fertilized eggs, and MI for percentage of mating interactions in couples) in adults *Nothobranchius furzeri* and their respective longevity. 132

Table IV. 4 Chronologie des expérimentations réalisées au cours de la présente étude afin de mesurer les différentes variables au cours du vieillissement de *N. furzeri*. ★ représente les âges auxquels ont été mesurées la SDA, les vitesses de nage critiques et spontanées ; ■ symbolise les périodes pendant lesquelles a été suivie la prise alimentaire et ont été récoltés les fèces. 151

Chapitre 5

Table V. 1 Heart mass/fish mass ratio ($\mu\text{g/g}$; mean \pm SE), cardiomyocytes volumes (μm^3 ; mean \pm SE) length (μm ; mean \pm SE) and wide (μm ; mean \pm SE) of *Nothobranchius furzeri* as a function of age, at the two experimental temperatures. For each variable and at each temperature, letters symbolize significant differences showed by a post-hoc test of Fisher (p-value < 0.05). Significant differences between 22 and 26 °C for each tested-age are symbolized by an asterisk. **193**

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. Contexte du projet de thèse

Au cours de leur vie, la plupart des êtres vivants connaissent des modifications physiologiques et morphologiques spécifiques à différentes phases de leur développement. Selon l'organisme considéré, les phases qui se suivent ne sont pas les mêmes ; par exemple, le cycle de vie de la plupart des vertébrés débute par le stade juvénile, caractérisé par une période de croissance somatique et de développement (Hamada *et al.*, 1996 ; Bjorndal *et al.*, 2000) ; ensuite, l'individu s'engage dans son stade adulte, qui correspond à une phase de reproduction (ou croissance gonadique), ainsi qu'une croissance pratiquement négligeable voire nulle (Casselman, 1987 ; Kozlowski, 1992 ; van der Veer *et al.*, 2009 ; Kooijman & Lika, 2014). Puis, vient la phase de sénescence qui se distingue par une dégradation progressive des fonctions de l'organisme, aboutissant à plus ou moins long terme à sa mort (Kirkwood & Austad, 2000).

Retarder l'entrée en phase sénescence, ou réduire les dégradations qui l'accompagnent permet non seulement d'augmenter la longévité, mais aussi d'améliorer la qualité de vie des individus. Ainsi, afin d'améliorer la santé et l'espérance de vie humaine, des efforts conséquents dans ce domaine de recherche ont été fournis depuis plus d'un siècle (Kirkwood & Austad, 2000 ; Kirkwood, 2005). Au cours de ces vingt dernières années, des manipulations expérimentales permettant d'allonger la longévité et de réduire les effets du vieillissement ont été établies chez des invertébrés ainsi que chez des vertébrés. Il s'agit par exemple d'une alimentation enrichie en resvératrol (*i.e.* molécule antioxydante ; Valenzano *et al.*, 2006a ; Liu *et al.*, 2015 ; Farris, 2015), ou d'une restriction calorique (Sohal & Weindruch, 1996 ; Weindruch & Sohal, 1997 ; Masoro, 2000, 2005 ; Speakman & Mitchell, 2011 ; Lin *et al.*, 2015), ou encore d'une réduction de la température corporelle (Ragland & Sohal, 1975 ; Valenzano *et al.*, 2006b ; Hemmer-

Brepson *et al.*, 2014 ; Lu & Hsu, 2015). Cependant, l'ensemble des mécanismes déclenchés par ces traitements anti-vieillissements n'est toujours pas élucidé.

Ainsi, est né le projet ALIVE (“Ageing and functional integrity: modulation by LIfe-extending treatments in a VERtebrate model with extremely short lifespan”), dont l'objectif était d'étudier, chez un vertébré soumis à deux traitements antivieillessement différents (*i.e.* restriction calorique et réduction de la température), les variations de trois fonctions biologiques clés au cours du vieillissement : la fonction immunologique, les performances moteurs et sensorielles et la fonction cardio-respiratoire.

Dans ce contexte, cette thèse, réalisée au sein du projet ALIVE, a eu notamment pour objectif de caractériser les variations et régulations de la fonction cardio-respiratoire au cours du cycle de vie d'un vertébré, le téléostéen *Nothobranchius furzeri*. De plus, ce travail visait à mettre en évidence l'effet de la température, en tant que traitement antivieillessement, sur le système cardio-respiratoire au cours du cycle de vie de l'organisme.

2. La fonction cardio-respiratoire

Le système cardio-respiratoire joue un rôle prépondérant au sein d'un organisme, en permettant l'apport et la distribution du dioxygène (O₂) et des nutriments à l'ensemble des cellules, et en rejetant les déchets du métabolisme cellulaire, dont le dioxyde de carbone (CO₂ ; Farrell, 2002 ; Claireaux *et al.*, 2005). Le système cardio-respiratoire est constamment régulé par des ajustements efficaces afin de maintenir, en fonction des besoins de l'individu et des conditions environnementales, un transport suffisant en dioxygène et en nutriments vers ses différents tissus, pour en assurer son bon

fonctionnement. Selon la phase du cycle de vie de l'animal, ses activités (*e.g.* croissance, reproduction, lutte contre les maladies, ...), donc ses besoins en nutriments et O₂, varient. Etudier les régulations et les modifications du système cardio-respiratoire au cours de la vie apporterait des connaissances très importantes sur la capacité de l'organisme à répondre aux différents besoins qu'il rencontre. De plus, cela permettrait non seulement de caractériser les modulations et dysfonctionnements qui apparaissent sur cette fonction face à l'entrée en sénescence, mais aussi d'élucider les régulations mises en place par les individus dont la durée de vie serait modulée par une réduction de température.

3. Espèce choisie pour l'étude

Bien que la plupart des travaux sur le vieillissement aient pour but d'améliorer l'espérance de vie humaine, ces études sont majoritairement menées sur des espèces modèles invertébrées et vertébrées, sélectionnées par rapport à leur faible espérance de vie. Les invertébrés sont largement favorisés en raison de leur longévité plus courte, minimisant ainsi la durée des expérimentations ; la drosophile *Drosophila melanogaster* a une espérance de vie de 37 jours, pour le nématode *Caenorhabditis elegans* elle est d'environ 18 jours (Lamb, 1964, 1968 ; Hosono *et al.*, 1982 ; Fernández *et al.*, 1999 ; Brys *et al.*, 2007 ; Burger *et al.*, 2010). Quelques espèces de vertébrés à longévité courte ont aussi été utilisées comme espèces modèles pour l'étude du vieillissement, dont la souris *Mus musculus* (Speakman *et al.*, 2004 ; Conti *et al.*, 2006) et le rat *Rattus norvegicus* (Mohammed *et al.*, 1993 ; Hasenöhr *et al.*, 1994), mais aussi des téléostéens, dont le poisson zèbre *Danio rerio* (Gerhard *et al.*, 2002 ; Kishi *et al.*, 2003 ; Kishi, 2004 ; Zhdanova *et al.*, 2008) et le guppy *Poecilia reticulata* (Woodhead *et al.*, 1983 ; Woodhead, 1984 ; Reznick *et al.*, 2005). Qu'il s'agisse des mammifères ou des téléostéens cités précédemment, bien que leur longévité soit considérée comme étant courte pour des

vertébrés, elle est tout de même de quelques années, rendant la phase pré-sénescence relativement longue. Depuis quelques dizaines d'années, une autre espèce modèle apparaît comme étant extrêmement pertinente dans ce domaine de recherche. En effet, le killi turquoise *Nothobranchius furzeri*, est un téléostéen d'eau douce ayant une durée de vie d'environ 6 mois, ce qui en fait le vertébré, dont le cycle de vie en captivité est maîtrisé, ayant la plus courte durée de vie (Terzibasi *et al.*, 2007 ; Cellerino *et al.*, 2015). De plus, Valenzano *et al.* (2006b) ont démontré qu'une réduction de la température d'acclimatation permettrait d'allonger la durée de vie chez *N. furzeri*, comme il a été observé chez de nombreuses autres espèces (*e.g.* chez le copépode *Mesocyclops leuckarti*, la drosophile *Drosophila melanogaster*, le cochon d'inde *cavia porcellus*, le chat *Felis silvestris catus*, et chez l'homme ; Rubner, 1908 ; Pearl, 1928 ; Gophen, 1976 ; Ren *et al.*, 2009, 2011). En raison de la courte durée de vie de *Nothobranchius furzeri*, ainsi que du caractère thermo-dépendant de sa longévité, ce vertébré sera donc l'espèce modèle choisi pour réaliser ce travail de thèse. Une réduction de température avait précédemment été démontrée.

4. Température

La température, en plus de son effet régulateur sur la longévité, est considérée comme l'un des principaux facteurs environnementaux susceptible d'influencer la physiologie des espèces ectothermes, dont les téléostéens (Fry, 1947 ; Reynolds & Casterlin, 1979 ; Claireaux & Lefrançois, 2007). Son effet sur le système cardio-respiratoire a été très largement étudié. Ainsi, une variation de température, en agissant notamment sur la cinétique des réactions biochimiques, entraîne des modifications de l'activité de cette fonction (*e.g.* Priede, 1985 ; Gehrke, 1988 ; Gehrke & Fielder, 1988 ; Wood & McDonald, 1997 ; Claireaux *et al.*, 2000 ; Mallekh & Lagardère, 2002 ; Sokolova &

Pörtner, 2003 ; Claireaux & Lefrançois, 2007 ; Pörtner & Farrell, 2008 ; Imbert-Auvray *et al.*, 2013).

Ce travail a eu pour objectif d'étudier la régulation thermo-dépendante de la fonction cardio-respiratoire au cours du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri*. De plus, cette thèse a permis d'explorer la relation entre capacité du système cardio-respiratoire et longévité des individus ; et ainsi d'identifier les régulations mises en place par ce système qui permettraient une modification de la durée de vie.

Pour cela, ce travail s'est effectué à trois échelles d'organisations biologiques différentes, la cellule, l'organe et l'individu, et s'est attaché à répondre plus particulièrement aux objectifs suivants :

1. Etudier les variations de la capacité métabolique au cours du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri* et le rôle régulateur de la température ;
2. Explorer le lien entre capacité métabolique, stratégies d'allocation énergétique et durée de vie ;
3. Evaluer l'effet de la température sur les changements de performances cardiaques au cours du vieillissement.

Ce manuscrit de thèse sera divisé en six parties. Le premier chapitre présente un état des connaissances concernant le processus de vieillissement, la bioénergétique, et le système cardio-vasculaire qui seront ensuite au centre des études présentées dans les chapitres 3 à 5. Le deuxième chapitre est consacré à la présentation du matériel biologique étudié ainsi qu'aux principales méthodologies employées dans les travaux scientifiques présentés. Dans le troisième chapitre, sera présenté le travail relatif aux variations des capacités métaboliques au cours de la vie de *Nothobranchius furzeri* et le rôle régulateur de la

température. Le quatrième chapitre concernera le suivi individuel d'un ensemble d'activités (*i.e.* croissance, reproduction, nage intense, nage de routine, prise alimentaire et digestion), ainsi que de la capacité métabolique au cours du vieillissement de *Nothobranchius furzeri* acclimaté à deux températures, et de leurs liens avec la longévité des individus. Le cinquième chapitre traitera de la variation des performances cardiaques au cours du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri*, et de l'impact de l'âge et de la température.

Enfin, le sixième chapitre se composera d'une discussion générale et abordera les perspectives d'évolution de ce travail de recherche.

CHAPITRE 1 :

ÉTAT DE L'ART

1.1 Vieillesse

Le vieillissement, ou sénescence, est un processus complexe et progressif. Il se caractérise par une détérioration physiologique et anatomique de l'organisme, accompagnée d'une augmentation du risque de maladie, aboutissant à sa mort (Harman, 1981 ; Kirkwood & Austad, 2000). La sénescence est généralement considérée comme une caractéristique universelle des êtres vivants, bien qu'il existe des organismes chez lesquels le vieillissement est exceptionnellement rare, ou n'a jamais été démontré (*i.e.* certains téléostéens et reptiles tels que le sébaste *Sebastes aleutianus* et la tortue mouchetée *Emydoidea blandingii*, Comfort, 1979 ; certaines méduses comme *Turritopsis nutricula*, Ma & Yang, 2010).

Le processus de vieillissement d'un organisme est modulé par des facteurs intrinsèques (*e.g.* le sexe, le génome, le statut physiologique, ...), mais aussi par des facteurs extrinsèques. Par exemple, la restriction calorique est connue pour étendre la durée de vie (1) chez certains vertébrés, dont des mammifères (*e.g.* le chien *Canis lupus familiaris*, Kealy *et al.*, 2002 ; Lawler *et al.*, 2005, 2008 ; le rat *Rattus norvegicus*, McCay *et al.*, 1935 ; Cohen *et al.*, 2004 ; Lin *et al.*, 2015 ; la souris *Mus musculus*, Bartke *et al.*, 2001 ; Goldberg *et al.*, 2015 ; Mitchell *et al.*, 2015 ; Roth & Ingram, 2015 ou des téléostéens McCay *et al.*, 1929 ; Comfort, 1963 ; Terzibasi *et al.*, 2009), ainsi que (2) chez certains invertébrés (*e.g.* le nématode *Caenorhabditis elegans*, la drosophile *Drosophila melanogaster* ; Braeckman *et al.*, 2006 ; Burger *et al.*, 2010). Une consommation de resveratrol, molécule antioxydante naturelle présente dans plus de 70 espèces de plantes, participe également à augmenter la durée de vie chez de nombreuses espèces animales (Howitz *et al.*, 2003 ; Valenzano *et al.*, 2006 ; Farris, 2015). La température est un autre paramètre environnemental modulant le

vieillesse. En effet, une faible baisse de la température corporelle augmente la durée de vie chez de nombreuses espèces. Cela a notamment été démontré chez des vertébrés, *e.g.* des mammifères tels que le hamster *Mesocricetus brandti* (Lyman *et al.*, 1981), la souris *Mus musculus* (Conti *et al.*, 2006), des téléostéens comme le guppy *Poecilia reticulata* (Comfort, 1963 ; Hemmer-Brepson *et al.*, 2014), le killi perle rayé *Cynolebias adloffi* (Liu & Walford, 1966, 1970, 1972, 1975), et l'espèce modèle de cette étude, le killi turquoise *Nothobranchius furzeri* (Valenzano *et al.*, 2006b) ; ainsi que chez certains invertébrés tels que la drosophile *Drosophila melanogaster* (Loeb & Northrop, 1917 ; Miquel *et al.*, 1976 ; Fuente & Miquel, 2009), la mouche *Musca domestica* (Ragland & Sohal, 1975 ; Sohal *et al.*, 1987) et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Hosono *et al.*, 1982 ; Kenyon *et al.*, 1993).

Bien qu'il soit possible d'influer sur la durée de vie des organismes à l'aide de facteurs extrinsèques tels que ceux présentés ci-dessus, les mécanismes déclenchés par ces facteurs et participant à la sénescence restent encore mal connus. De très nombreuses études ont été menées afin d'élucider le processus de sénescence très complexe ; il en a découlé une multitude de théories (environ 400 ; Weinert & Timiras, 2003). Toutefois, aucune d'entre-elles ne permet d'expliquer de façon univoque l'ensemble des phénomènes participant à la sénescence. Elles ne sont pas pour autant nécessairement contradictoires, mais, au contraire, se complètent en décrivant différents aspects de mêmes processus. Afin d'illustrer ce propos, certaines de ces théories, parmi les plus acceptées, sont présentées ci-après.

1.1.1 Quelques théories liées au processus de vieillissement

1.1.1.a Théories évolutionnistes

La sélection naturelle permet la conservation des individus les plus aptes à survivre ou à se reproduire dans leur environnement. Pour induire l'évolution d'un trait biologique particulier dans une population sous l'effet de la sélection naturelle, ce trait biologique doit varier d'un individu à l'autre, cette variation interindividuelle doit être héritable et corrélée à celle du succès reproducteur ou de la probabilité de survie des individus (Williams, 2001). La sénescence n'a pas été éliminée par la sélection naturelle, bien qu'elle ne rentre pas dans les critères de traits biologiques habituellement conservés : elle réduit la survie et participe à amoindrir la capacité de reproduction. Weismann (1889) a, le premier, exprimé l'idée que la sénescence était destinée à « laisser la place aux jeunes » (voir l'article de synthèse de Gavrilov & Gavrilova, 2002). D'après Medawar (1952), des traits génétiques conduisant à la vieillesse et à la mort sont apparus au cours de l'évolution. Ne s'exprimant que tardivement dans la vie d'un animal, ils n'auraient pas été éliminés ; en effet, la période de reproduction de l'organisme étant sur le déclin voire terminée, la pression de sélection est faible pour les gènes s'exprimant à cet âge. Williams (2001) a complété les idées de Medawar avec la théorie de la pléiotropie antagoniste : les gènes responsables du vieillissement ne seraient pas éliminés au cours de l'évolution, non seulement parce que leurs effets délétères se manifesteraient après la période de reproduction, mais aussi parce que les gérontogènes (*i.e.* gènes du vieillissement) auraient un effet bénéfique avant la période de reproduction, en permettant une meilleure aptitude à la reproduction, par exemple en optimisant la croissance des tissus gonadiques (Magalhães & Church, 2005). Les gérontogènes seraient donc pléiotropes (*i.e.* gènes déterminant plusieurs caractères phénotypiques) : ils induiraient un bénéfice précoce et

un effet néfaste tardif, c'est-à-dire qu'ils pourraient faciliter la reproduction d'un organisme et, une fois cette période terminée, ces mêmes gènes entraîneraient le vieillissement de l'organisme. Ainsi, selon cette théorie, vieillir serait le « prix à payer » pour de meilleures aptitudes à la reproduction (Mangel, 2001). L'ensemble de ces théories recherchent donc les causes de la sénescence ; contrairement aux théories ci-dessous qui s'intéressent, quant à elles, aux mécanismes impliqués dans ce processus.

1.1.1.b Théories génétiques

Plusieurs travaux ont mis en évidence des relations étroites entre processus de vieillissement et génome. Par exemple, la manipulation de certains gènes (*e.g. daf-2, methuselah, indy, inr, chico*) a été accompagnée d'un allongement de la longévité chez le nématode *Caenorabditis elegans* (Kenyon *et al.*, 1993) et chez la drosophile, *Drosophila melanogaster* (Spencer *et al.*, 2003). Le vieillissement serait donc contenu dans le programme génétique de chaque cellule et ferait partie d'un ensemble cohérent, menant tout individu de la naissance à la mort. Hayflick (1965) a, quant à lui, mis en évidence une limite programmée de réplifications cellulaires (*i.e.* chez l'homme, la cellule peut en moyenne se répliquer entre 60 et 100 fois). Une explication à cette limite est apportée par le phénomène d'apoptose (*i.e.* mort cellulaire programmée), processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal génétiquement programmé. La limite de réplication a été également expliquée par la détérioration dans le temps de courtes séquences répétées d'acide désoxyribonucléique ou ADN se trouvant aux extrémités des chromosomes, les télomères. Ils assurent une protection chromosomique contre les effets du temps et de l'environnement. Cependant, la structure des télomères raccourcit à chaque cycle de division cellulaire, et lorsque leur longueur

devient critique, les cellules ne peuvent plus se diviser et deviennent sénescences, provoquant à terme le vieillissement des organes (Harley *et al.*, 1992 ; Campisi, 1999 ; Flores *et al.*, 2005).

1.1.1.c Théories métaboliques

Une des plus vieilles théories sur le processus de vieillissement a été initiée par les travaux de Rubner (1908). Ces travaux ont suggéré que la dépense énergétique totale au cours de la vie était constante pour l'ensemble des espèces. Ainsi, les individus ayant un rythme d'activité élevé auraient une longévité plus courte. Continuant ces recherches, Pearl (1928) établit la **théorie du « Rate of Living »**, selon laquelle la longévité d'un organisme varierait de manière inversement proportionnelle à son taux métabolique basal, c'est à dire le métabolisme minimum permettant à l'organisme de maintenir ses fonctions vitales. La **théorie des radicaux libres** de Harman (1955), enrichit la théorie de Pearl en identifiant le métabolisme comme acteur du processus de vieillissement. En effet, des produits métaboliques toxiques, encore appelés les dérivés réactifs de l'oxygène (« **reactive oxygen species** », **ROS**), se forment au cours du métabolisme oxydatif (Harman, 1992 ; Cadenas & Davies, 2000 ; Speakman, 2003 ; Barja, 2004 ; Selman *et al.*, 2012). Ce sont des molécules extrêmement réactives qui oxydent certaines autres molécules présentes dans leur environnement proche (*i.e.* lipides, les protéines et l'intégrité de l'ADN) et sont à l'origine de lésions cellulaires, on parle alors de **stress oxydant**. Pour se protéger des effets délétères des ROS, les organismes disposent cependant d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes, provenant de deux sources différentes : l'une est apportée par l'alimentation (*i.e.* vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque) ; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (*i.e.* superoxyde

dismutase, glutathion peroxydase, catalase), de protéines (*i.e.* ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et de systèmes de réparation des dommages oxydatifs comme les endonucléases. Mais, avec l'âge, l'accumulation progressive de ROS dans l'organisme, ainsi que l'affaiblissement des défenses antioxydantes, contribueraient au vieillissement des tissus et des organes, conduisant à terme à la mort (Harman, 1992 ; Cadenas & Davies, 2000 ; Speakman, 2003 ; Barja, 2004 ; Selman *et al.*, 2012).

1.1.2 Métabolisme & longévité

Ainsi, d'après la théorie des radicaux libres, un métabolisme élevé produisant une grande quantité de ROS, accélérerait le processus de vieillissement (Ragland & Sohal, 1975 ; Sohal & Allen, 1986 ; Ku *et al.*, 1993 ; Ku & Sohal, 1993 ; Speakman *et al.*, 2002 ; Speakman, 2003, 2005). Cependant, cette théorie reste très controversée. En effet, d'autres études portant sur la variation du métabolisme avec l'âge suggèrent des tendances contraires. Certains auteurs ont ainsi observé une longévité plus élevée associée à une augmentation métabolique chez la souris *Mus musculus*, le rat *Rattus norvegicus* (Hollooszy & Smith, 1986 ; Liang *et al.* 2003 ; Speakman, 2003 ; Speakman *et al.*, 2004), et le nématode *Caenorhabditis elegans* (Brys *et al.*, 2007). Cette dichotomie pourrait avoir des causes variées ; l'une d'entre-elles pourrait être d'ordre méthodologique. Le métabolisme aurait été quantifié chez des organismes ayant des statuts physiologiques différents selon les auteurs. Certains auteurs auraient mesuré le taux métabolique basal (Rønning *et al.*, 2014) et d'autres, le métabolisme maximal (*i.e.* taux métabolique mesuré chez un individu réalisant une activité intense ; Speakman *et al.*, 2004). Certains auteurs, eux, ont mesuré le taux métabolique de routine (Chappell *et al.*, 2003), correspondant au statut métabolique d'un individu ayant des activités spontanées, ce qui en fait un taux très variable dans le temps. En effet, de par sa variabilité, la mesure du taux métabolique

de routine contribuerait aux différences de résultats concernant la relation entre métabolisme de routine et longévité ont été obtenues. Par exemple, chez des individus ayant une durée de vie plus grande, le taux métabolique de routine observé était plus faible, notamment chez la drosophile (Pearl 1928 ; Lamb 1968 ; Miquel *et al.*, 1976 ; Mair *et al.*, 2003), la mouche *Musca domestica* (Sohal & Buchan, 1981) et la souris *Mus musculus* (Rubner, 1908 ; Sohal, 1990 ; Ku *et al.*, 1993). En contradiction avec ces résultats, certains auteurs ont constaté que ce taux métabolique de routine variait positivement avec la longévité chez la souris *Mus musculus* et le rat *Rattus norvegicus* (Bruckdorfer, 2005 ; Holloszy & Smith, 1986 ; Liang *et al.* 2003 ; Speakman, 2003 ; Speakman *et al.*, 2004) et chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Brys *et al.*, 2007).

Afin de caractériser la relation entre métabolisme et sénescence, il est donc important de standardiser les études à venir, via la quantification d'une « jauge » métabolique, non dépendante du niveau d'activité de l'animal, mais illustrant sa **capacité métabolique** à un âge donné, et qui permettrait ainsi d'intégrer l'ensemble des taux métaboliques mesurables chez un individu.

1.1.3 Etude du métabolisme

Tout organisme a besoin d'énergie afin de réaliser l'ensemble de ses activités. Cette énergie est majoritairement produite grâce à l'oxydation de substrats énergétiques (*e.g.* glucides, lipides & protéines) issus de la transformation de la matière organique ingérée. Le terme de « métabolisme » correspond à l'ensemble des réactions biochimiques se produisant au sein d'un organisme pour lui permettre notamment de se maintenir en vie, se développer, se reproduire, et de répondre aux stimuli de son environnement (Fry, 1971 ; Claireaux & Lefrançois, 2007 ; Pörtner & Farrell, 2008).

Le métabolisme se divise en deux types : (i) l'anabolisme, qui regroupe l'ensemble des voies de synthèse permettant la transformation de molécules simples en molécules complexes (*e.g.* protéines, lipides & glucides) et qui joue un rôle important dans la régénération des tissus et dans la croissance et (ii) le catabolisme qui correspond à la dégradation de molécules complexes en molécules plus simples et plus petites avant leur intégration au cycle de Krebs, par exemple. Les processus cataboliques produisent de l'énergie sous forme de chaleur, ainsi que de l'adénosine triphosphate (ATP). Les réserves en ATP dans l'organisme étant faibles, il est nécessaire de produire cette molécule en permanence. Dans ce manuscrit de thèse, le métabolisme énergétique ne fera référence qu'au catabolisme.

La production d'ATP peut se dérouler en présence d'oxygène, on parle alors de métabolisme aérobie, mais aussi en absence d'oxygène, le métabolisme étant dans ce cas anaérobie. Hormis les mécanismes impliqués, une des différences entre ces deux voies de production réside en la différence du nombre de molécules d'ATP produites (*i.e.* 2 ATP par la voie anaérobie contre 34 ATP par la voie aérobie). Dans ce manuscrit de thèse, le métabolisme énergétique fait donc référence au métabolisme aérobie.

1.1.4 Bioénergétique

La bioénergétique participe à la compréhension des interactions entre les organismes et leur environnement en (1) quantifiant le cadre énergétique dans lequel l'individu doit réaliser l'ensemble de ses activités, et (2) en évaluant l'allocation de l'énergie au sein de l'organisme, en fonction de ses besoins et des contraintes environnementales auxquelles il est soumis (Fry, 1971 ; Pörtner & Farrell, 2008 ; Pörtner, 2010). Fry (1971), considère l'animal comme étant un système ouvert dans lequel l'énergie circule. Les processus

métaboliques, transformant l'énergie brute (nourriture ou matière organique) en énergie chimique (l'ATP), sont considérés comme étant le « moteur physiologique » produisant l'énergie nécessaire à l'ensemble des activités de l'animal. Le terme « activité » y est employé au sens large, et comprend non seulement (i) le travail mécanique, comme la nage ou la digestion, mais aussi (ii) le travail de biosynthèse, permettant la croissance et le renouvellement cellulaire, ainsi que (iii) le travail de transport, comme les échanges ioniques. L'énergie étant majoritairement issue de processus aérobies, la capacité énergétique d'un organisme est souvent estimée à travers son taux métabolique aérobie, c'est-à-dire via sa consommation d'oxygène (*e.g.* Fry, 1971 ; Duthie, 1982 ; Priede, 1985 ; Wieser, 1985 ; Steffensen *et al.*, 1994 ; Lefrançois & Claireaux, 2003 ; McKenzie *et al.*, 2007 ; Lucas *et al.*, 2014a). Fry (1971) a ainsi défini trois différents taux métaboliques en fonction du statut physiologique de l'organisme, et donc de sa consommation d'oxygène ; d'où l'importance de mesurer le niveau métabolique dans des conditions d'activités données.

1.1.5 Les différents taux métaboliques

Le **taux métabolique standard** (« *Standard Metabolic Rate* » en anglais, SMR, Figure I. 1.) correspond à la consommation d'oxygène minimale nécessaire au maintien des fonctions vitales d'un organisme (*e.g.* ventilation, travail cardiaque, osmorégulation, renouvellement cellulaire, etc.) ; il est mesuré chez un individu à jeun, au repos et hors maturation sexuelle.

Le **taux métabolique maximal** (« *Maximal Metabolic Rate* » en anglais, MMR, Figure I. 1.) représente la capacité maximale de transport en O₂ d'un individu. C'est une estimation de la dépense énergétique maximale atteinte lors d'activités soutenues (Fry,

1971 ; Priede, 1985 ; Pörtner & Farrell, 2008 ; Dupont-Prinet *et al.*, 2009 ; Jourdan-Pineau *et al.*, 2010). Le MMR est aussi appelé taux métabolique actif (« Active metabolic rate », AMR) par certains auteurs (*e.g.* Schurmann & Steffensen, 1997 ; Lefrançois & Claireaux, 2003 ; Claireaux *et al.*, 2005).

Le **taux métabolique de routine** (« *Routine Metabolic Rate* » en anglais, **RMR**, Figure I. 1.) correspond au taux métabolique moyen observé chez un individu effectuant des activités spontanées. Pour le mesurer, l'individu doit être libre de ses mouvements. Le RMR dépend donc du niveau d'activité de l'animal, mais aussi de sa stratégie énergétique (répartition du temps et de l'énergie alloués aux diverses activités telles que l'alimentation, la reproduction, la nage ; (Brett & Groves, 1979 ; Calow, 1985 ; Dupont-Prinet, 2009 ; Dupont-Prinet *et al.*, 2009, 2010 ; Jourdan-Pineau *et al.*, 2010). Le RMR correspond au métabolisme de base auquel s'ajoute le coût des activités discrétionnaires et spontanées, notamment la nage et la digestion. Il oscille donc entre le SMR et le MMR.

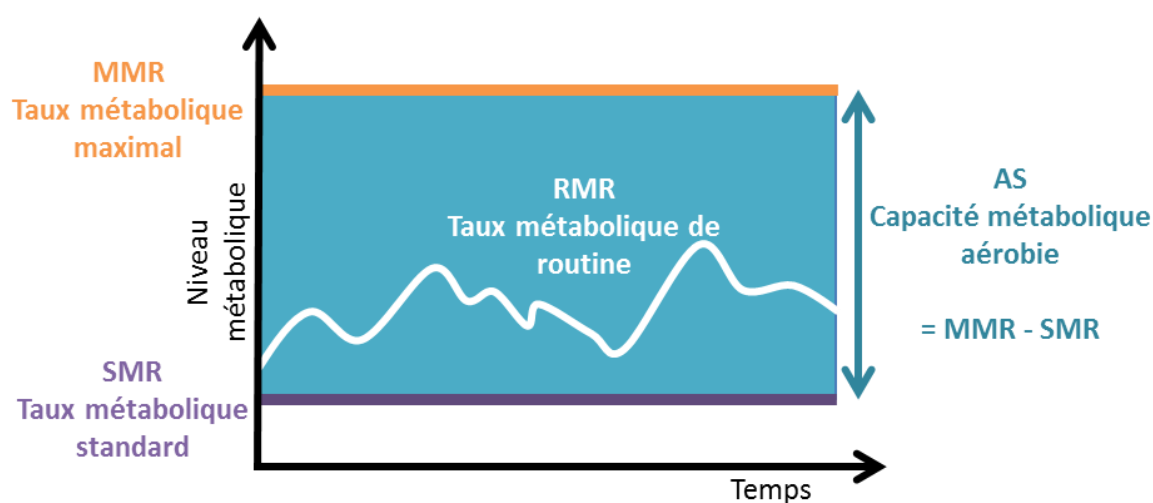


Figure I. 1 Représentation schématique des différents taux métaboliques en fonction du temps et de la variation associée du niveau d'activité : SMR (taux métabolique standard), MMR (taux métabolique

maximal), RMR (taux métabolique de routine). L'AS (capacité métabolique) correspond à la différence entre MMR et SMR, et représente l'énergie totale dont dispose l'organisme pour réaliser l'ensemble de ses activités.

La différence entre le taux métabolique maximal et le taux métabolique standard a été définie par Fry (1971) comme étant la **capacité métabolique aérobie**, ou registre aérobie (« *Aerobic Metabolic Scope* » en anglais, **AS**, Figure I. 1.). L'AS représente ainsi la **quantité globale d'oxygène** pouvant être consommée par l'organisme pour qu'il réalise l'ensemble de ses activités non-obligatoires ou discrétionnaires, et de ce fait, est souvent appelée « *capacité pour l'activité* », ou encore « capacité pour la croissance » (« *scope for growth* » en anglais ; Brett, 1976 ; Naylor *et al.*, 1989 ; Tateda *et al.*, 2015). L'AS est ainsi considérée par de nombreux auteurs comme un « proxy de la fitness » de l'animal, c'est-à-dire un indicateur de sa capacité à survivre et se reproduire dans un environnement donné (Priede, 1985 ; Claireaux & Lefrançois, 2007).

Etant donné que (1) l'AS correspond à la capacité d'un individu à consommer de l'énergie, donc indirectement à produire de l'énergie, et non à son niveau d'activité à un instant donné, et que (2) cette « jauge » est un **bon indicateur de la « fitness »**, nous avons donc choisi d'étudier le lien entre métabolisme et vieillissement via la quantification de la capacité métabolique de l'individu.

D'après la théorie des radicaux libres, une réduction du métabolisme induite par une baisse raisonnable de la température, est associée à une diminution de la production des produits métaboliques toxiques (*i.e.* ROS), et permettrait d'allonger la durée de vie (Rubner, 1908 ; Pearl, 1928 ; Liu & Walford, 1966, 1972 ; Lamb, 1968 ; Gophen, 1976 ; Mair *et al.*, 2003 ; Valenzano *et al.*, 2006b). De par son effet sur la capacité métabolique et

sur la longévité, la température a été le facteur extrinsèque sélectionné pour réaliser ce travail de thèse.

1.1.6 Effet de la température sur l'AMS

La température est considérée comme l'un des principaux facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la physiologie des ectothermes (Fry, 1947 ; Reynolds & Casterlin, 1979 ; Claireaux & Lefrançois, 2007). Plus précisément, la température, en agissant sur la cinétique des réactions biochimiques impliquées dans le métabolisme, influence ainsi directement les métabolismes standard et maximal (*e.g.* Brett, 1969 ; Priede, 1985 ; Schurmann & Steffensen, 1997 ; Lefrançois & Claireaux, 2003 ; Pörtner & Farrell, 2008). Ainsi, la capacité métabolique varie elle aussi en fonction de la température environnementale à laquelle est soumis l'organisme. Par exemple, une baisse de la température, même modique, entraîne une baisse de la capacité métabolique, ou de la « capacité pour l'activité » (Brett, 1969 ; Fry, 1971 ; Brett & Groves, 1979 ; Claireaux & Lagardère, 1999 ; Pörtner, 2001, 2010 ; Lefrançois & Claireaux, 2003).

Dans ce cadre, les hypothèses suivantes ont été testées :

- Au cours de la vie, la capacité métabolique présente deux phases bien distinctes, 1) une première phase d'augmentation de la capacité métabolique au cours du stade juvénile, associée à l'augmentation des besoins énergétiques de la croissance somatique puis gonadique au cours du stade juvénile ; 2) une seconde phase durant le stade sénescence, pendant laquelle la capacité métabolique diminue de façon drastique en raison de l'altération de la fonction cardio-vasculaire au cours du vieillissement.

- La réduction de la température induit une diminution de la capacité métabolique des individus qui se répercute sur leur niveau d'activité. La baisse des taux métaboliques permet de diminuer la production de ROS, donc la détérioration des tissus et organes lors de la phase sénescence, ce qui ralentit le déclin de la capacité métabolique au cours du vieillissement.

Le système cardio-vasculaire a un rôle déterminant pour la capacité métabolique des individus. En effet, il permet notamment le transport des nutriments et de l'oxygène, indispensable au métabolisme énergétique (Priede, 1977 ; Bennett, 1980 ; Claireaux *et al.*, 2005 ; Farrell, 2007). La modulation des performances de l'activité du système cardio-vasculaire au cours du vieillissement, ainsi que par la température ont donc une importance considérable sur le métabolisme de l'organisme (Wood & McDonald, 1997 ; Farrell, 2002, 2007). L'approche écophysiologique de ce travail de thèse sera donc associée à une caractérisation des modifications des performances cardiaques au cours du vieillissement.

1.2 Système cardio-vasculaire

Chez les téléostéens, l'oxygène est capté par diffusion au niveau des branchies puis transporté à travers l'ensemble de l'organisme par convection. Le système cardio-vasculaire assure ces mouvements de convection, nécessaires à la fois à l'approvisionnement en oxygène des tissus, mais aussi au transport de substances comme le CO₂, les nutriments dérivés de l'hydrolyse des aliments ou les hormones.

Le système circulatoire chez les vertébrés est constitué de quatre éléments essentiels : une pompe (cœur), un « conteneur » (vaisseaux sanguins), un milieu convectif (sang) et un

« système de commande » (incluant des facteurs neuronaux, endocrines et paracrines). A la différence d'autres vertébrés, les systèmes respiratoire et circulatoire des poissons sont en « série » et seul du sang veineux traverse le cœur. La circulation principale (primaire) y est relativement simple : le sang quitte le cœur pour s'oxygéner au niveau des branchies ; de là, le sang oxygéné est distribué aux différents organes via les vaisseaux systémiques, pour finalement retourner au cœur.

1.2.1 Anatomie du cœur

Le cœur de poisson téléostéen est constitué de 2 chambres successives : un atrium (ou oreillette) et un ventricule (Figure I. 2). En amont de l'atrium, la veine est dilatée en un sinus veineux qui contribue à un apport continu de sang au cœur. En aval du ventricule se trouve le bulbe artériel, caractérisé par un épaissement de la paroi de l'aorte ventrale. L'atrium n'est pas particulièrement musclé, et sa contraction produit seulement une petite pression d'impulsion. Au contraire, le ventricule est un tissu particulièrement musculueux, et permet ainsi l'expulsion efficace du sang vers les branchies.

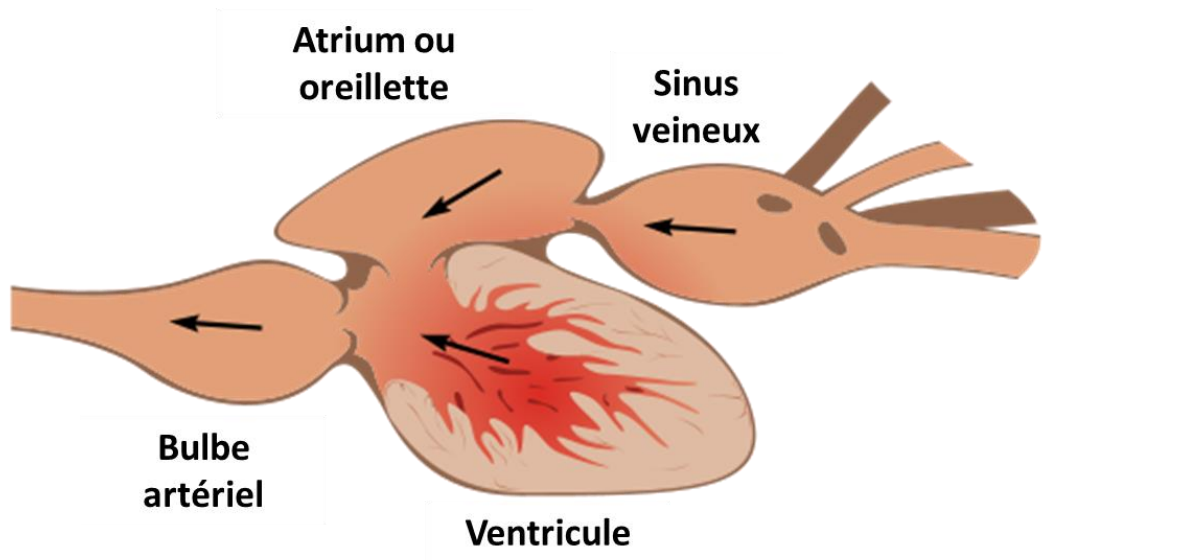


Figure I. 2 Schéma de l'anatomie du cœur de poisson. Les flèches représentent le sens de circulation du sang au travers des différentes chambres du cœur, l'atrium et le ventricule (modifié d'après *anatomybodyblog.com*)

1.2.1.a Sinus veineux

Le sinus veineux présente des parois très fines (Santer, 1985). Il collecte le sang veineux provenant des canaux de Cuvier, des veines hépatiques et des veines jugulaires antérieures pour le diriger vers l'atrium. Le rôle fonctionnel majeur du sinus veineux est d'initier et de contrôler le rythme cardiaque. En effet, il abrite les tissus spécialisés dans la stimulation cardiaque (cellules pacemaker), initiateurs des battements cardiaques (Laurent, 1962 ; Santer, 1985 ; Satchell, 1991).

1.2.1.b Atrium ou oreillette

L'atrium des téléostéens, au contraire des mammifères, a un volume presque identique à celui du ventricule. Il présente une paroi mince, peu extensible avec de fines trabécules

musculaires permettant d'appliquer la pression nécessaire au remplissage du ventricule (Santer, 1985).

1.2.1.c Ventricule

Le ventricule a une morphologie et une vascularisation qui varie en fonction de l'espèce (Santer, 1985 ; Gamperl & Farrell, 2004). Le ventricule a une masse qui varie entre 0,03 et 0,4% de la masse corporelle, et tend à augmenter chez les espèces les plus actives (Poupa *et al.*, 1981). Par exemple, une espèce benthique comme le flet d'Europe *Platichthys flesus* présente une masse ventriculaire d'environ 0,035 % de la masse de l'organisme (Matikainen & Vornanen, 1992 ; Joaquim *et al.*, 2004), alors que chez le thon *Katsuwonus pelamis*, cette proportion atteint 0,38 % (Farrell *et al.*, 1992 ; Blank *et al.*, 2004). Cette variabilité est associée à des différences interspécifiques du volume d'éjection systolique (volume de sang éjecté à chaque contraction) et de la pression sanguine générée.

1.2.1.d Bulbe artériel

Le bulbe artériel se caractérise par un épaississement de la paroi de l'aorte ventrale. Cette paroi non contractile s'étend à chaque battement cardiaque afin d'absorber le flux pulsatile de sang éjecté du ventricule et créer ainsi un flux de sang plus continu dans la circulation systémique. Le sang provenant du ventricule va ainsi entrer dans la circulation branchiale via 4 à 7 artères branchiales afférentes à partir de l'aorte ventrale.

1.2.2 Battement cardiaque

Le cœur n'a pas besoin d'une stimulation nerveuse externe pour se contracter. In vitro, il a un rythme intrinsèque dû aux cellules pacemaker. In vivo, il est cependant sous

l'influence principale du système nerveux autonome. Ce système est composé de deux voies : la voie adrénergique (système nerveux sympathique) et la voie cholinergique (système nerveux parasympathique). A ces deux voies neurales s'ajoute une voie humorale adrénergique. Au repos, l'activité cardiaque est la résultante d'un équilibre entre ces différentes voies de régulation. Au cours d'une activité soutenue et/ou en conditions de stress, la fréquence et la force de contraction du cœur sont augmentés via le système nerveux sympathique, alors que le système nerveux parasympathique ralentit la fréquence cardiaque. D'un point de vue neuro-hormonale, c'est la stimulation adrénergique (neuronale et humorale) qui augmente la fréquence, tandis que la stimulation cholinergique (vagale) la diminue (Farrell & Jones, 1992).

La voie adrénergique est une voie très importante chez les poissons. Elle met en jeu deux médiateurs chimiques appartenant aux catécholamines : la noradrénaline et l'adrénaline (Cameron, 1979 ; Pennec & Le Bras, 1984 ; Reid *et al.*, 1998 ; Taylor & Miller, 2001). L'adrénaline va agir sur le tissu cardiaque via la voie humorale, par exemple en réponse à un stress ou d'une activité intense (Farrell, 1982; Nilsson *et al.*, 1993). Dans le cœur, les récepteurs des catécholamines sont de deux types: α - et β - adrénorécepteurs. La présence et la densité de ces récepteurs varient selon les tissus et les espèces concernés (Reid *et al.*, 1998). Généralement, les catécholamines, en se liant aux β -adrénorécepteurs, génèrent un effet inotrope positif, c'est-à-dire une augmentation de la contraction ventriculaire (Farrell, 1982), ainsi qu'un effet chronotrope positif, c'est-à-dire une augmentation du rythme cardiaque (Butler & Metcalfe, 1988; Nilsson *et al.*, 1993). Les catécholamines peuvent également se lier aux α -adrénorécepteurs, mais les effets sont mineurs comparés à ceux des β -adrénorécepteurs. On parle alors de tonus accélérateur adrénergique.

La voie cholinergique passe par l'action de l'acétylcholine, libérée par le nerf vague localisé dans le tissu pacemaker et atrial (région sino-atriale). Ce neurotransmetteur va induire des effets chronotropes négatifs via la stimulation des récepteurs muscariniques (Saito, 1973) : la voie cholinergique agit comme un frein en ralentissant la fréquence cardiaque. Par exemple, chez certains poissons, la bradycardie observée en milieu hypoxique est due à la voie cholinergique (Farrell & Jones, 1992). On parle de tonus inhibiteur cholinergique.

1.2.3 Cardiomyocytes

Le muscle cardiaque des poissons, comme chez les autres vertébrés, est constitué de fibres qui s'organisent en réseau. Chaque fibre se compose de nombreuses cellules contractiles distinctes et connectées, les cardiomyocytes. La contraction de ces cardiomyocytes est permise par le flux de calcium entre les milieux extra et intracellulaires, mais aussi au sein même de ces cellules.

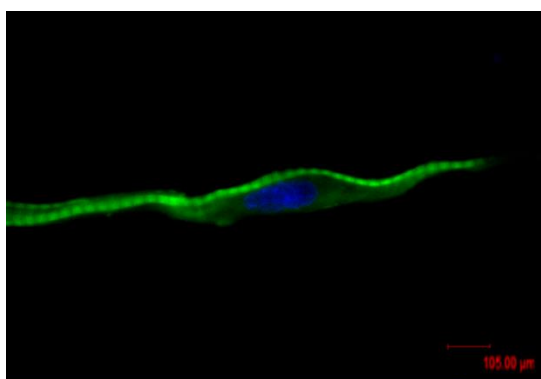


Figure I. 3 Cardiomyocyte de *Nothobranchius furzeri* marqué avec une sonde DAPI-Phalloïdine. Le DAPI marque le noyau (bleu) et la phalloïdine-FITC s'associe à l'actine et marque ainsi les membranes (vert). Le cardiomyocyte de *N. furzeri* est de forme longiligne, et mononucléé. (photographie réalisée au cours de ce travail de thèse, et présentée dans le cadre du Chapitre 5)

Les cardiomyocytes sont longs et minces, et la plupart ont seulement un noyau (Figure I. 3). Cette forme fine et allongée par rapport aux cardiomyocytes des mammifères, leur confère (1) un important ratio surface-volume, et (2) une distance plus courte pour la diffusion du Ca^{2+} du milieu extracellulaire vers le centre de la cellule. Chez les téléostéens, contrairement aux muscles squelettiques et cardiaques des mammifères, le sarcolemme (*i.e.* membrane plasmique des fibres musculaires) ne possède pas de système tubulaire typique. Ce système joue habituellement un rôle fondamental dans la propagation du potentiel d'action vers l'intérieur des cardiomyocytes, en direction des myofibrilles (protéines contractiles ou myofilaments) et du réticulum sarcoplasmique (stock calcique intracellulaire), initiant la contraction des cardiomyocytes. Les cardiomyocytes présentent un nombre élevé de mitochondries qui occupent une position centrale dans la cellule ; les myofibrilles étant plutôt situées dans la partie périphérique, ce qui présente l'avantage, en l'absence de système tubulaire, de réduire la distance de diffusion du Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. Le réticulum sarcoplasmique (SR, « sarcoplasmic reticulum » en anglais) est présent autour des myofibrilles et surtout sous le sarcolemme (Santer, 1974 ; Vornanen, 1997). Il peut constituer une réserve interne d'ions Ca^{2+} , variable selon le niveau d'évolution des organismes mais également variable selon le niveau d'activité des poissons, et peut jouer un rôle fondamental dans la contraction cardiaque, en particulier chez les mammifères. La plasticité de l'activité calcique des cardiomyocytes en fonction des variations de facteurs internes (*e.g.* âge) et de facteurs externes (*e.g.* température) pourrait déterminer les performances cardiaques des téléostéens : force, rythme cardiaque, volume d'éjection systolique et débit cardiaque (Aho & Vornanen, 1998 ; Shiels *et al.*, 2002a ; Farrell, 2007)

1.2.4 Couplage excitation-contraction

Le calcium est considéré comme indispensable à la contraction et à la relaxation cardiaque (Vornanen *et al.*, 2002). L'augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire est l'élément indispensable permettant le couplage entre l'excitation cardiaque et la contraction des cardiomyocytes. Ce processus appelé "Couplage Excitation-Contraction" (ECC ; « excitation-contraction coupling » en anglais) est initié par les cellules pacemaker situées au niveau du sinus veineux (Saito, 1969). Ces cellules génèrent un potentiel d'action spontanée (PAs) se propageant de cellule en cellule via les jonctions communicantes (ou jonctions gap), ce qui va induire la dépolarisation de la membrane du sarcolemme qui, par l'intermédiaire du ECC, va provoquer une augmentation du calcium intracellulaire. La dépolarisation de la membrane du sarcolemme induit en effet l'entrée du Ca^{2+} dans les cardiomyocytes (*i.e.* Figure I. 4, flèches bleues) par les canaux calciques de type L voltage-dépendants, et, en proportion moindre, via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX ; Figure I. 4 ; Vornanen, 1999).

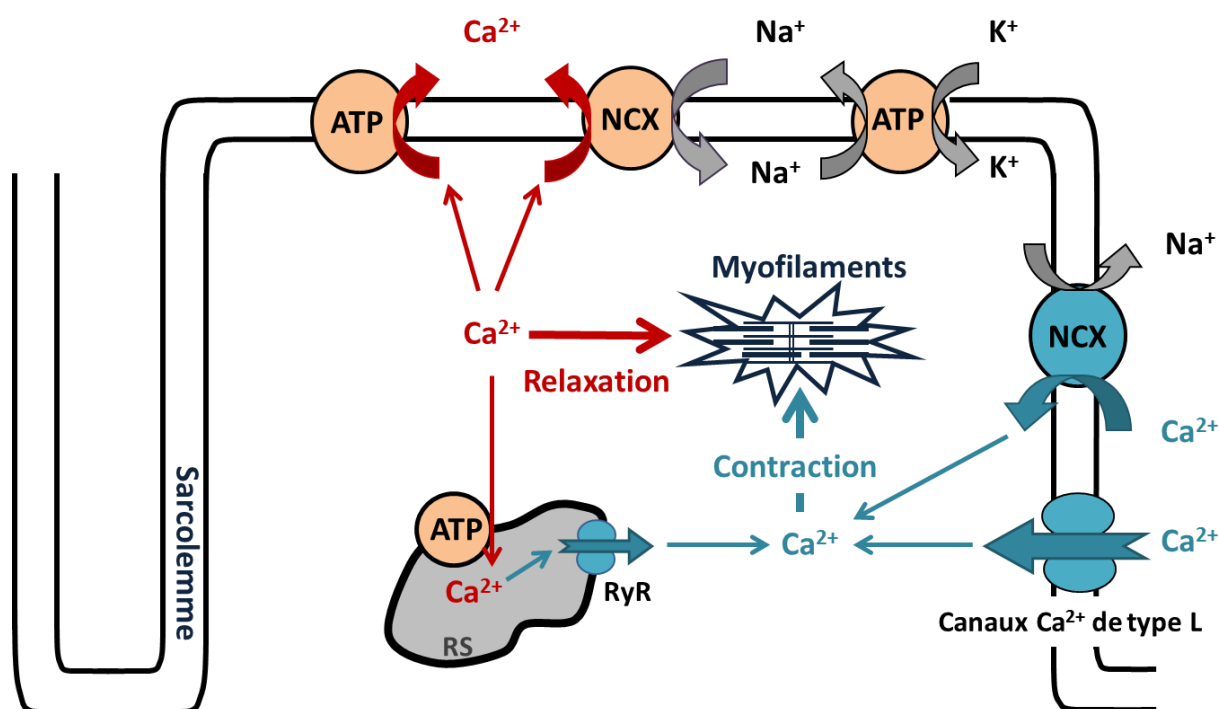


Figure I. 4 Représentation schématique d'un cardiomyocyte. SR : réticulum sarcoplasmique ; ATP : pompes calciques chargées (i) d'expulser le calcium à l'extérieur du cardiomyocytes (on parle alors de pompe ATPase calcique du sarcolemme, ou PCMA pour « plasma membrane Ca^{2+} ATPase » en anglais ; ou (ii) de pomper le calcium du cytosol vers le réticulum sarcoplasmique (on parle alors de la pompe ATPase calcique du SR ou SERCA id) ; NCX : échangeur sodium/calcium (entrée ou sortie de calcium de la cellule) ; RyR : canal calcique ligand-dépendant, sensible à la ryanodine. Les canaux ioniques (voltage-dépendants sur le sarcolemme ou ligand-dépendants sur la membrane du RS) représentés en bleu permettent l'augmentation de calcium intracellulaire, induisant la contraction des myofilaments ; les pompes ou échangeurs ioniques représentés en rouge/orangé permettent la diminution du calcium intracellulaire, donc la relaxation des myofilaments.

L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire suite à son entrée au niveau du sarcolemme peut induire une libération supplémentaire de Ca^{2+} par le RS, cette fois-ci via les récepteurs à la ryanodine (RyR) distribués à sa surface (*e.g.* Fabiato, 1983). En d'autres mots, l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire dans les cardiomyocytes induit potentiellement la libération d'une plus grande quantité de Ca^{2+} à partir des stocks intracellulaires ; ce phénomène étant connu sous le nom de « Ca^{2+} Induced- Ca^{2+} release » ou CICR.

Chez le poisson, le degré de participation du SR à la libération de Ca^{2+} , et donc sa contribution à la contraction du muscle cardiaque, dépend du type de tissu cardiaque

(plus important dans le tissu atrial que dans le tissu ventriculaire), de la température (détaillé en partie II.3.5), mais aussi de l'espèce. En effet, les espèces plus actives ayant tendance à présenter un cœur plus performant, sollicitent plus le Ca^{2+} provenant du SR que les autres, permettant ainsi des fréquences de contraction élevées (*e.g.* thon jaune *Thunnus albacares* ; Shiels *et al.*, 1999). Ceci est d'autant plus important pour cette espèce qui régule son débit cardiaque non pas en variant son débit systolique comme la plupart des téléostéens, mais en modifiant sa fréquence de contraction cardiaque (Shiels *et al.*, 1999).

Quant à la relaxation des cardiomyocytes, elle n'est possible que lorsque la concentration de Ca^{2+} intracellulaire diminue. Le transport du Ca^{2+} au dehors du cytosol s'effectue par le biais de 3 voies : 1) la pompe Ca^{2+} -ATPase du SR (SERCA) ; 2) l'échangeur NCX du sarcolemme et 3) la pompe Ca^{2+} -ATPase du sarcolemme (PMCA ; Bridge *et al.*, 1988 ; Bers *et al.*, 1989).

Afin de caractériser les modulations du ECC, il est possible d'étudier finement les variations de concentration du calcium intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), représentant la somme des flux de calcium intra et extracellulaires. A chaque cycle de ECC, doivent ainsi être quantifiées 1) l'amplitude de ces flux de calcium (*i.e.* représentant la quantité de calcium mobilisée lors de la contraction du cardiomyocyte) qui est directement liée à la force de contraction cardiaque (Yue, 1987 ; Shiels *et al.*, 2002a) ; plus l'amplitude est grande, plus la force de contraction sera importante 2) les cinétiques d'entrée du calcium (*i.e.* la vitesse des flux de calcium jusqu'à ce que $[\text{Ca}^{2+}]_i$ soit maximale), et 3) les cinétiques de sortie de calcium, jusqu'à un retour au $[\text{Ca}^{2+}]_i$ initial. Ce dernier point est un indicateur de la capacité du cardiomyocyte à passer au cycle ECC suivant, permettant ainsi une nouvelle

contraction cardiaque. Plus les cinétiques d'entrée et de sortie de calcium sont importantes, moins la cellule mettra de temps à se contracter, puis à se relaxer, et subséquemment pourra se contracter à nouveau plus rapidement (Eisner *et al.*, 2000 ; Shiels *et al.*, 2002a ; Vornanen *et al.*, 2002).

1.2.5 Vieillessement & performances cardiaques

Le processus de vieillissement a un fort impact sur le système cardio-vasculaire. En effet, la sénescence conduit à des modifications structurales et fonctionnelles de cet organe (Lakatta & Levy, 2003). L'ensemble de ces détériorations conduit à une augmentation des maladies cardio-vasculaires (*e.g.* athérosclérose, hypertension, infarctus du myocarde ; Anversa *et al.*, 1986 ; Lakatta & Levy, 2003) pouvant être responsables de la mort des organismes. Parmi les modifications structurelles du cœur de vertébré au cours de la sénescence, s'observe un élargissement du cœur du à l'hypertrophie de l'atrium et du ventricule. L'hypertrophie de ces deux chambres cardiaques s'accompagne d'une augmentation et d'un changement des propriétés physiques du collagène (*i.e.* protéines ayant pour fonction de conférer aux tissus une résistance mécanique à l'étirement), induisant des fibroses (Lakatta, 2003 ; Lakatta & Levy, 2003b ; Strait & Lakatta, 2012). Les cardiomyocytes s'élargissent et leur nombre diminue (Anversa *et al.*, 1986a ; Gonzalez and Barrios, 2015 ; Kaushik & Engler, 2014 ; Khrapko *et al.*, 2015 ; Lakatta & Levy, 2003; Olivetti *et al.*, 1991 ; Sujkowski & Wessells, 2015 ; Torella *et al.*, 2004). De plus, le nombre de mitochondries présentes dans le tissu cardiaque se réduit (Suh *et al.*, 2003). Certains changements fonctionnels du cœur se mettent également en place. Un cœur âgé a une machinerie mitochondriale moins performante à produire de l'énergie. De plus, les performances de détoxification des ROS du cœur sont réduites (Hansford, 1983 ; Anversa *et al.*, 1986b ; Olivetti *et al.*, 1991 ; Lakatta, 1993, 2003 ; Di Lisa *et al.*,

1998 ; Pepe *et al.*, 1999 ; Lesnefsky *et al.*, 2001 ; Lakatta & Levy, 2003a, 2003b). Le vieillissement amène également à des changements de la fréquence et de la force de contraction cardiaque, ainsi que du volume d'éjection systolique (Strait & Lakatta, 2012).

Ces différences structurelles et fonctionnelles dépendantes de l'âge ont des effets sur les flux de calcium au sein des cardiomyocytes. Il a notamment été observé une réduction du stock de calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique chez la souris *Mus musculus* (Jiménez-Moreno *et al.*, 2008) et le rat *Rattus norvegicus* (Michaelis *et al.*, 1984 ; Narayanan, 1987 ; Gomez *et al.*, 1996). Elle est accompagnée d'une diminution du flux via les canaux de type L, provoquant une baisse de l'amplitude du calcium total entrant dans la cellule, donc une force amoindrie de contraction des cardiomyocytes (Gonzalez & Barrios, 2015 ; Herraiz-Martínez *et al.*, 2015). Les régulations et variations du ECC au cours du vieillissement des téléostéens n'ont, quant à eux, pas encore fait l'objet d'études.

Ainsi, ce travail de thèse permettra d'évaluer les variations des performances cardiaques au cours du cycle de vie d'un téléostéen, *Nothobranchius furzeri*. Pour cela, sera faite une investigation des modifications structurelles, accompagnée d'une analyse fonctionnelle via l'étude du ECC des cardiomyocytes vieillissant. De plus, nous étudierons la régulation thermo-dépendante de la structure et de la fonctionnalité du cœur au cours du cycle de vie du modèle biologique de ce travail.

1.2.6 Température & performances cardiaques

En effet, l'impact de la température sur le système cardio-vasculaire des poissons a été largement décrit. Ces organismes ont des ajustement de leurs performances cardiaques en fonction de la température par un ensemble de mécanismes agissant à différents niveaux

organisationnels (*i.e.* moléculaires, cellulaires, tissulaires et organiques ; Smith *et al.*, 1976 ; Harper *et al.*, 1995 ; Aho & Vornanen, 1998 ; Coyne *et al.*, 2000 ; Shiels *et al.*, 2002a, 2002b ; Costa *et al.*, 2005, 2015 ; Imbert-Auvray *et al.*, 2013). Parmi l'ensemble de ces mécanismes, la régulation des flux de calcium a un effet très important, en modulant la force de contraction des cardiomyocytes. Ainsi, la plasticité des échanges calciques des cardiomyocytes en fonction de la température peut permettre de maintenir les performances cardiaques (Tiitu & Vornanen, 2002). La stratégie d'adaptation dépend cependant de l'espèce, et plus précisément de son niveau d'activité spontanée en fonction des conditions environnementales (Aho & Vornanen, 1999 ; Vornanen *et al.*, 2002). Une première stratégie est observée chez des espèces qui restent dormantes à des températures plus froides. Parmi celles-ci, la carpe *Carassius carassiu*, espèce très eurytherme, tolère des environnements allant de 1 °C à 36 °C (Crawshaw, 1984). Lorsque cette espèce est soumise à des températures froides, sa fréquence cardiaque va diminuer et sera accompagnée d'une augmentation du temps nécessaire au processus de ECC, et une période avant une nouvelle contraction des myocytes plus longue (Matikainen & Vornanen, 1992 ; Tiitu & Vornanen, 2002 ; Cooke *et al.*, 2003). Chez cette espèce, le SR ne sera pas, ou peu impliqué dans le ECC aux températures froides (Matikainen & Vornanen, 1992).

Une stratégie opposée est, par exemple, observée chez le salmonidé *Oncorhynchus mykiss*, espèce qui reste active dans une large gamme de température, allant de 1 °C à 25 °C. Chez cette espèce, une acclimatation aux températures froides entraîne une augmentation de la masse et de la fréquence cardiaque, ainsi qu'une accélération du rythme des contractions du cœur afin de compenser la réduction de la contractilité cardiaque et l'augmentation de la viscosité sanguine (Vornanen *et al.*, 2002 ; Gamperl &

Farrell, 2004). Cette accroissement du volume du cœur est principalement induite par une hypertrophie des cardiomyocytes (Driedzic & Gesser, 1988 ; Aho & Vornanen, 1999). Afin de palier à l'augmentation du volume des cardiomyocytes, la contribution du réticulum sarcoplasmique au ECC est accrue, permettant une augmentation de la quantité de calcium disponible pour la contraction/relaxation des myofilaments (Shiels *et al.*, 2002a). En effet, à cause de l'hypertrophie, la distance de diffusion du calcium externe vers les protéines contractiles internes étant plus importante, le SR constitue un relais mobilisable par le mécanisme de CICR. Lorsque ces salmonidés sont acclimatés à des températures plus élevées, la vitesse de dépolarisation des cellules pacemakers augmente, réduisant ainsi la durée des potentiels d'action (Vornanen *et al.*, 2002). Suite à cela, le rythme des cycles de ECC s'accélère, et l'implication du SR pour la mobilisation du calcium diminue, l'apport calcique provenant alors majoritairement du milieu extracellulaire via les canaux calciques de type L voltage-dépendants et des échangeurs NCX (Aho & Vornanen, 1999, 2001 ; Vornanen *et al.*, 2002). De plus, ces voies d'entrées de Ca^{2+} deviennent plus efficaces à température élevée, permettant un influx de calcium plus important. Ainsi, le rythme cardiaque et la force de contraction du myocarde sont plus élevés, entraînant l'augmentation du débit cardiaque (Harper *et al.*, 1995 ; Zaza *et al.*, 1996 ; Gamperl & Farrell, 2004). L'augmentation du débit sanguin et de l'efficacité d'apport d' O_2 et de nutriments au reste de l'organisme est en adéquation avec l'élévation des demandes métaboliques dépendantes de l'augmentation de température (Gamperl & Farrell, 2004 ; Claireaux *et al.*, 2005 ; McKenzie *et al.*, 2007).

L'objectif de cette approche physiologique sera donc de mettre en évidence si la modulation de la durée de vie par la température s'accompagne de la mise en place de mécanismes de régulation impliquant la régulation du calcium interne dans le cœur

vieillissant de *Nothobranchius furzeri*. L'hypothèse est la suivante : au cours du vieillissement, est observée une hypertrophie du cœur, associée à un déclin de l'ECC (*i.e.* moins de calcium mobilisé pour la contraction/relaxation des cellules cardiaques, cinétiques des flux de Ca^{2+} réduite). Une seconde hypothèse est que la baisse thermo-dépendante de la capacité métabolique est associée à une réduction de la fréquence cardiaque permise par une réduction de la quantité du Ca^{2+} mobilisée lors du ECC, ainsi que des cinétiques des flux de calcium plus grandes. Ces changements sont caractéristiques de la stratégie adoptée par des espèces restant dormantes aux températures basses.

CHAPITRE 2 :

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Le modèle biologique étudié, *Nothobranchius furzeri*

Le killi turquoise, *Nothobranchius furzeri*, est un téléostéen annuel d'eau douce de l'ordre des Cyprinodontiformes. Son aire de répartition s'étend du Soudan jusqu'au Nord de l'Afrique du Sud (Cellerino *et al.* 2015). Cette espèce comprenant des individus d'une taille allant jusqu'à 6,5 cm (Huber 1996), développe un fort dimorphisme sexuel: Les mâles sont de taille plus imposante et plus colorés (le plus souvent jaune et rouge) que les femelles qui sont translucides (Figure II. 2 ; Cellerino *et al.* 2015). Ces petits poissons occupent des habitats marginaux et austères aux autres espèces : les mares isolées et temporaires (Taylor *et al.*, 2008). Les *N. furzeri* éclosent à la saison des pluies, ont une croissance très rapide, et arrivent à maturité sexuelle en seulement quelques semaines (Figure II. 1 ; Polačik *et al.*, 2011 ; Blažek *et al.*, 2013). A ce stade, les femelles pondent quotidiennement des œufs qui vont rester dans le substrat vaseux pendant toute la saison sèche, grâce à une phase de diapause pendant laquelle le développement des embryons s'arrête, ce qui leur permet de survivre à la période de sécheresse. Quand la saison des pluies est de retour, la mare se remplit de nouveau, et l'éclosion des œufs enkystés est déclenchée par un ensemble de facteurs externes n'étant pas tous connus (Cellerino *et al.*, 2015).

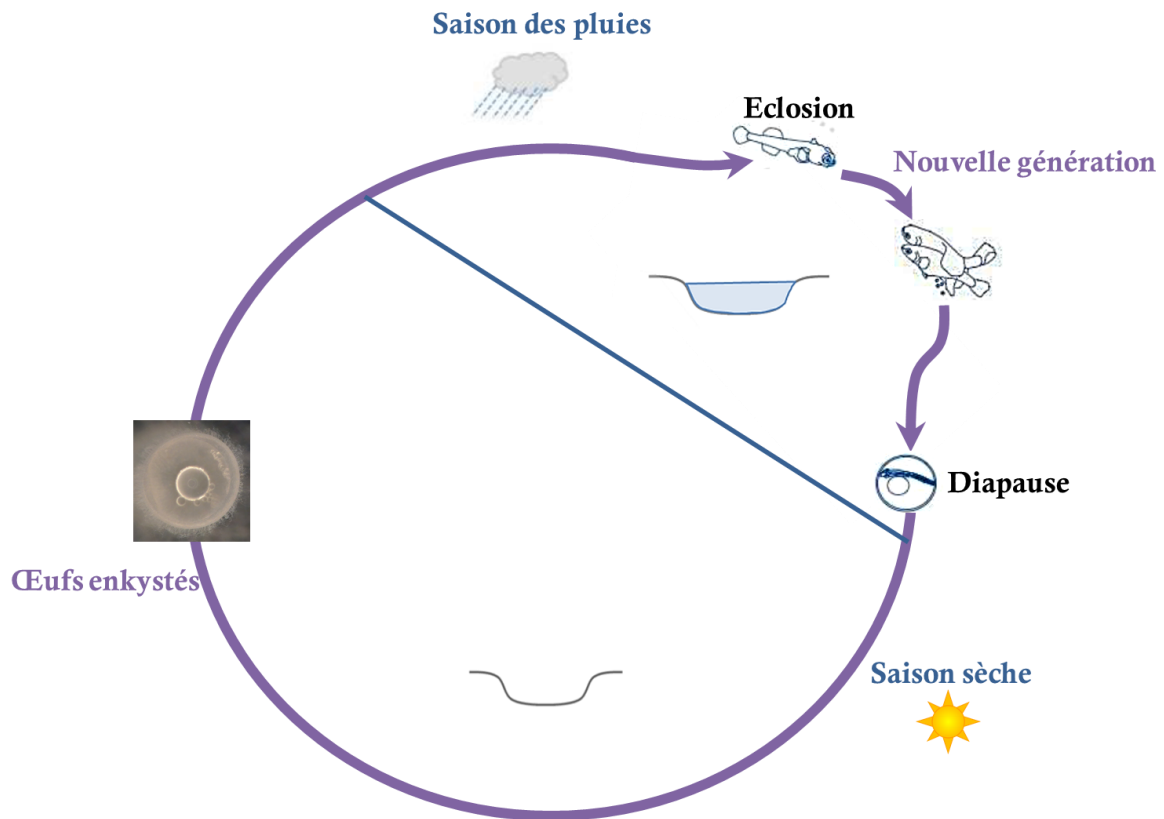


Figure II. 1 Cycle de vie de *Nothobranchius furzeri* d'après Cellerino *et al.*, 2015.

Chez cette espèce, les individus sont polygynandres, c'est à dire que les mâles et les femelles changent souvent de partenaires entre chaque ponte. Les épisodes de ponte ont lieu plusieurs fois par jour, et n'aboutissent à la ponte que d'un seul œuf par épisode (Blažek *et al.*, 2013 ; Vrtílek & Reichard, 2014). Chaque femelle pond généralement de 20 à 50 œufs par jour, mais ce nombre est fortement impacté par de nombreux facteurs tels que la ressource alimentaire, la taille des femelles ou encore leur âge. (Blažek *et al.*, 2013). Quant aux mâles, ils sont en permanence prêts à s'accoupler, et stimulent activement les femelles afin de provoquer la ponte.

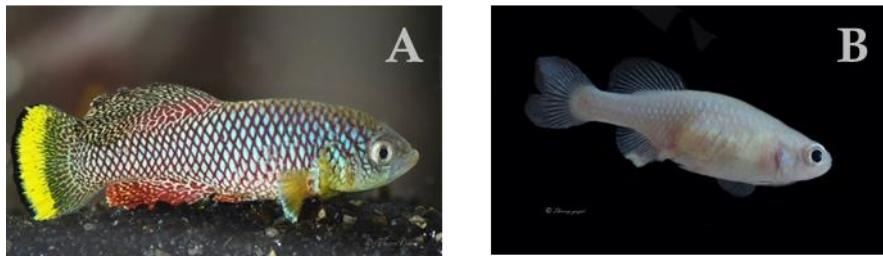


Figure II. 2 (A) Mâle et (B) femelle *Nothobranchius furzeri*. Crédit photo : Thierry Guyot

2.1 Élevage des poissons

Les différentes expérimentations présentées dans ce manuscrit de thèse ont été réalisées sur des individus de la souche MZM 0410 (souche provenant d'œufs récoltés au Mozambique en avril 2010). Ces individus ont été élevés au laboratoire LIENSs (Littoral, Environnement et Sociétés, Université de La Rochelle) dans une salle thermo-régulée ($25.8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.4\text{ }^{\circ}\text{C}$) avec un cycle de lumière artificielle de 12 h : 12 h (jour : nuit). Ils étaient nourris deux fois par jours *ad libitum* avec des vers de chironomes décongelés (Genade *et al.*, 2005). Les individus utilisés dans ce travail ont été répartis en 3 colonnes d'élevage, comprenant chacune 12 aquariums de 30 L (L x l x h: 0.50 x 0.30 x 0.25 m ; Figure II. 3).

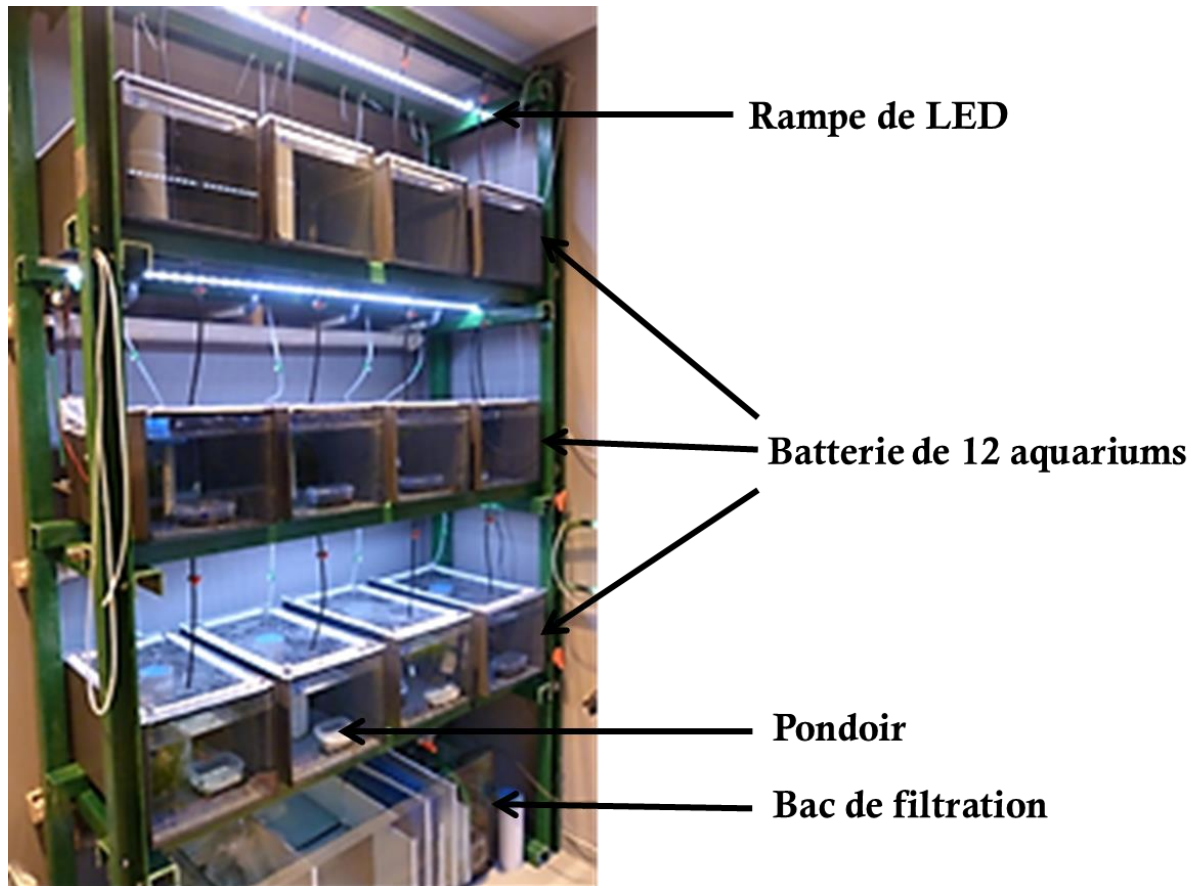


Figure II. 3 Colonne d'élevage comprenant un bac de filtration et 12 aquariums de 30 L avec chacun un pondoir.

Lors de cette thèse, il s'agissait d'explorer le rôle régulateur de la température sur les variations de la fonction cardio-respiratoire au cours du vieillissement de *N. furzeri*. Ainsi, certains poissons ont été acclimatés à une température de $25,6 \pm 0,5$ °C (abrégé en 26 °C), considérée comme optimale pour le développement gonadique et somatique de cette espèce par plusieurs auteurs (Genade *et al.*, 2005 ; Valenzano *et al.*, 2006b ; Cellerino *et al.*, 2015). Une réduction de la température d'acclimatation permettant notamment d'allonger la durée de vie de *Nothobranchius furzeri* (Valenzano *et al.*, 2006b), certains individus ont été acclimatés à une température inférieure à l'optimum thermique. Afin de trouver la température la plus basse possible permettant tout de même une reproduction et une croissance raisonnable, des poissons ont été ainsi acclimatés à environ 20 et 22 °C.

Les poissons acclimatés à 20 °C ne montrant aucune activité de reproduction et ayant un important retard de croissance par rapport aux individus exposés à 26 °C, cette température a donc été considérée comme étant trop basse pour notre étude. Il a donc été décidé que la température basse à laquelle *Nothobranchius furzeri* serait acclimaté pour ce travail de thèse serait de $22,1 \pm 0,8$ °C (abrégé en 22 °C). De plus, cette température basse de 22 °C a déjà été choisie dans le cadre d'une étude travaillant également sur l'effet antiviellissement d'une réduction de température chez notre modèle biologique *Nothobranchius furzeri* (Valenzano *et al.*, 2006a).

Une qualité optimale de l'eau de chaque colonne était préservée grâce à un bac de filtrations mécanique et biologique, une oxygénation continue, et le renouvellement quotidien d'au moins 40 litres d'eau osmosée enrichie en sels minéraux d'une conductivité d'environ 1300 $\mu\text{S.m}^{-1}$ (conductivité idéale pour cette espèce ; observation personnelle). Les poissons étaient nourris deux fois par jours *ad libitum* avec des vers de chironomes décongelés (Genade *et al.*, 2005).

La reproduction des individus a été possible dans chacun des aquariums grâce à la mise en place de pondoirs (L x l x h: 0.10 x 0.10 x 0.07 m), remplis à 1/3 de sable noir servant de substrat sur lequel les femelles pondaient leurs œufs. Deux fois par semaine, le sable était tamisé afin de récupérer les œufs. Ensuite, les œufs fécondés, identifiés grâce à leur double membrane, étaient séparés des œufs non fécondés sous loupe binoculaire (Figure II. 4), puis disposés sur de la tourbe (Terrarium peat ; tourbe blonde) dans une boîte de pétri et mis un incubateur à 29 °C. Il est important de préciser qu'afin d'éviter les effets parentaux, il était pris soin d'inclure au sein des boîtes de pétri des œufs provenant de géniteurs différents. Le temps nécessaire au développement des œufs chez cette espèce varie de quelques semaines à plusieurs mois (Cellerino *et al.*, 2015). Les embryons prêts à

éclore se reconnaissent par des yeux bien développés et de couleur dorée, ainsi que par une colonne vertébrale nettement visible par sa pigmentation noire (Figure II. 4C).

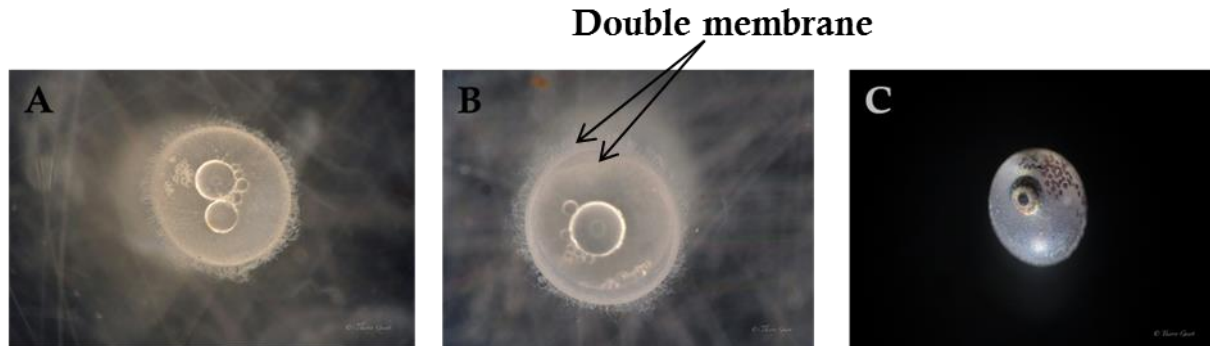


Figure II. 4 (A) Œuf non fécondé ; (B) Œuf fécondé caractérisé par une double membrane, et (C) Œuf contenant un embryon de *Nothobranchius furzeri* prêt à éclore. Crédit photo : Thierry Guyot

Les embryons sont alors plongés dans un bac d'éclosion (1 L ; L x l x h: 0,30 x 0,20 x 0,10 m; maximum 100 œufs par bac) contenant de l'eau acide ($\text{pH} \approx 5$), à conductivité faible ($k \approx 200 \mu\text{S}$), et à température basse ($T \text{ } ^\circ\text{C} \approx 12 \text{ } ^\circ\text{C}$). Cette qualité d'eau, en se rapprochant de la qualité d'eau des mares temporaires lors de l'arrivée de la saison des pluies, favorise l'éclosion en fragilisant la membrane des œufs. Les individus fraîchement éclos étaient rapidement sortis des bacs d'éclosion, pour être placés dans des bacs d'alvinage contenant une eau à conductivité faible ($k \approx 200 \mu\text{S}$), et à une température d'environ $24 \text{ } ^\circ\text{C}$. Les juvéniles étaient maintenus dans ces bacs d'alvinage jusqu'aux 10 premiers jours post-éclosions. Durant cette période, l'eau y était renouvelée à 50 % deux fois par jour, en augmentant progressivement la conductivité afin de permettre aux alevins une acclimatation lente à une eau d'environ $1300 \mu\text{S.m}^{-1}$, identique à celle des aquariums des colonnes d'élevage. Les juvéniles étaient nourris deux fois par jour avec des *nauplii* d'artémies écloses depuis 24 h. Au dixième jour après éclosion, des groupes de 30 individus ont été répartis au hasard dans chacun des aquariums des trois différentes

colonnes (*i.e.* deux colonnes à 26 °C et une à 22 °C). A ce stade, les poissons étaient nourris deux fois par jour avec des *nauplii* d'artémies écloses depuis 48 h et, ce, jusqu'à leur cinquième semaine post-éclosion, à partir de laquelle les individus ont été nourris deux fois par jour avec des larves de chironomes (Europrix) fraîchement décongelées.

La reproduction a été suivie tout au long du cycle de vie de 3 groupes de poissons acclimatés à 22 °C et 3 groupes de poissons acclimatés à 26 °C, via les récoltes d'œufs bihebdomadaires (Chapitre 4). La croissance de l'ensemble des individus a également été suivie pour chaque température en procédant à une biométrie, qui consistait à mesurer la masse (g), la longueur standard (*i.e.* longueur du poisson en mesurant de l'avant de la tête jusqu'au début de la nageoire caudale ; cm), la longueur totale (cm) et l'épaisseur (cm) des poissons à plusieurs âges répartis au cours du cycle de vie : 5 et 7 semaines représentant le stade juvénile ; 12, 18 et 24 semaines pour le stade adulte ; et enfin 30, 36 et 42 semaines pour le stade sénescence (Chapitre 4). De plus, les individus morts étaient retirés des aquariums chaque jour afin d'obtenir la durée de vie de chacun des poissons (Chapitre 3).

Un suivi individuel a été réalisé dans le cadre de ce travail de thèse. Ainsi, pour chaque individu appartenant à cette expérimentation, ont été mesurés sa durée de vie, sa capacité métabolique, ainsi qu'un ensemble de variables représentatives du niveau des activités de reproduction, de croissance, de digestion, de prise alimentaire, de locomotion. En raison du temps considérable requis par un tel suivi, ces mesures n'ont été réalisées que sur deux périodes, une première lors du stade adulte, et une seconde chez des individus sénescents (Chapitre 4).

2.2 Caractérisation des performances cardiaques

Les performances cardiaques ont été évaluées chez des poissons acclimatés aux deux températures, et âgés de 7 semaines (juvéniles), 18 semaines (adultes) et 36 semaines (sénescence ; Chapitre 4). Il a été choisi de limiter les âges testés afin d'obtenir un nombre de réplicas suffisant par condition. En effet, le nombre de poissons dédié à l'étude du système cardio-vasculaire se devait d'être réduit car ces expérimentations nécessitaient l'euthanasie des poissons.

2.2.1 Dissociation des cardiomyocytes

Les poissons destinés à l'étude des performances cardiaques étaient anesthésiés dans des bacs de 1 L contenant de l'eau provenant de leur aquarium, à laquelle était ajouté 0.008% d'eugénol (Sigma). Leur cœur était ensuite rapidement prélevé sous loupe binoculaire (*c.f.* Chapitre 5.3.2.1.). Puis, les cardiomyocytes étaient dissociés selon le protocole suivant (Figure II. 5) :

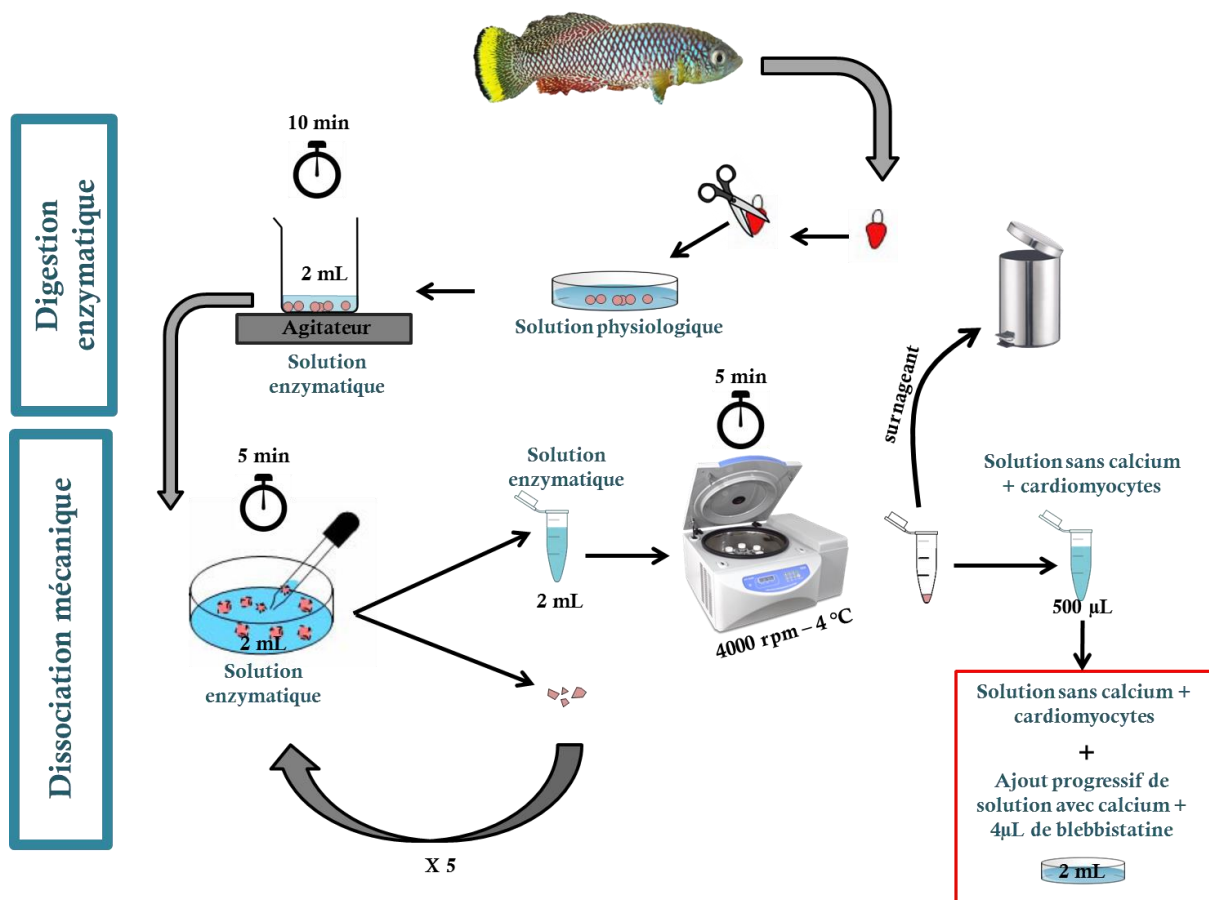


Figure II. 5 Représentation schématique du protocole de dissociation des cardiomyocytes du cœur de *Nothobranchius furzeri*.

Digestion enzymatique: les cœurs étaient découpés en petits morceaux qui étaient ensuite déposés dans un bécher contenant 2 mL de solution enzymatique sans calcium (*c.f.* Chapitre 5.3.2.1.) permettant la digestion des tissus. Cette solution était ensuite délicatement agitée pendant 10 min sous agitation magnétique.

Dissociation mécanique: les morceaux de cœur étaient placés dans 2 mL de la solution enzymatique, puis agités mécaniquement pendant 5 min à l'aide d'une pipette pasteur rodée à la flamme. Ceci avait pour effet de libérer les myocytes. La solution enzymatique était prélevée, placée dans un eppendorf puis centrifugée pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant était ensuite éliminé, et les cardiomyocytes sédimentés étaient remis en

suspension dans 500 μ L de solution sans calcium (*c.f.* Chapitre 5.3.2.1.). A l'issue de cette première phase de dissociation, les morceaux de tissus qui n'étaient pas encore dissociés étaient déposés à nouveau dans de la solution enzymatique sans calcium pour être soumis à un nouveau cycle de dissociation. Cette opération était renouvelée jusqu'à ce qu'il ne reste plus de tissus à dissocier (de 4 à 5 fois). Pour finir, chacune des solutions contenant les cardiomyocytes isolés en suspension dans 500 μ L de solution sans calcium était déposée dans une boîte de pétri avec un fond en verre. Un ajout progressif de calcium (5 min) était effectué directement dans la boîte de pétri, par l'addition d'une solution avec calcium supplémentée de 4 μ L de blebbistatine (*c.f.* Chapitre 5.3.2.1.) permettant que les cardiomyocytes ne se contractent pas.

2.2.2 Etude des flux de calcium au sein des cardiomyocytes lors du ECC

L'observation des cellules a été possible grâce à un microscope à fluorescence inversé (LEICA, DMI6000B). Soit les cardiomyocytes d'une boîte subissaient un marquage à l'ANEPPS afin d'étudier leur morphologie (*i.e.* présence ou non d'invagination dans le sarcolemme), soit elles étaient marquées via la sonde fluorescente FLUO4-AM (acétoxyméthylester, *c.f.* Chapitre 5.3.2.1., *i.e.* permet d'établir la quantité de calcium entrant et sortant des cellules lors du phénomène de couplage excitation-contraction). Chaque cellule isolée marquée au FLUO4-AM a été stimulée avec l'une ou l'autre de ces deux solutions pharmacologiques, une solution hyper-potassique (ou 100mM de K^+), afin de dépolariser la cellule, ou une solution de caféine (10 mM) afin de respectivement mobiliser les stocks internes de calcium ; et ainsi explorer les mécanismes responsables du couplage excitation-contraction (*c.f.* Chapitre 5.3.2.1.). Ceci entraîne l'augmentation de calcium intracellulaire permettant la contraction de la cellule, qui induit ensuite la

diminution du calcium intracellulaire, permettant la relaxation cellulaire. Lors d'une stimulation hyperpotassique, la concentration de calcium intracellulaire augmente via l'ensemble des stocks disponibles (extracellulaires via possiblement les canaux calciques voltage-dépendants et le NCX & au sein du SR ; Figure I. 4, *c.f.* Chapitre 5.3.2.1.), tandis qu'une stimulation à la caféine n'entraîne que la libération du calcium contenu dans le SR. Ceci permet d'estimer l'implication du SR dans le couplage excitation contraction (ECC, « excitation-contraction coupling » en anglais), permettant la contraction des cardiomyocytes.

Plus l'entrée de calcium est rapide, plus les mécanismes impliqués dans l'augmentation de calcium sont efficaces et plus la contraction cardiaque est considérée comme rapide. La contraction dépend de l'amplitude maximale de calcium mobilisée. Ainsi, différents paramètres de la réponse calcique induite lors d'une stimulation ont été mesurés (Figure II. 6) :

- L'amplitude, correspondant à la quantité de calcium mobilisé lors du ECC et renseignant sur la force de contraction des cardiomyocytes : quelle canal et échangeur, possiblement mobilisation du RS par quel canal ?
- La cinétique d'entrée du calcium, renseignant sur la vitesse de l'entrée de calcium lors de la contraction cellulaire
- La cinétique de sortie du calcium, renseignant sur la vitesse de sortie (via la Pompe Ca^{2+} -ATPase du sarcolemme, ou PMCA) ou de repompage (via la Pompe ATPase calcique du SR, ou SERCA) de calcium lors de la relaxation cellulaire :

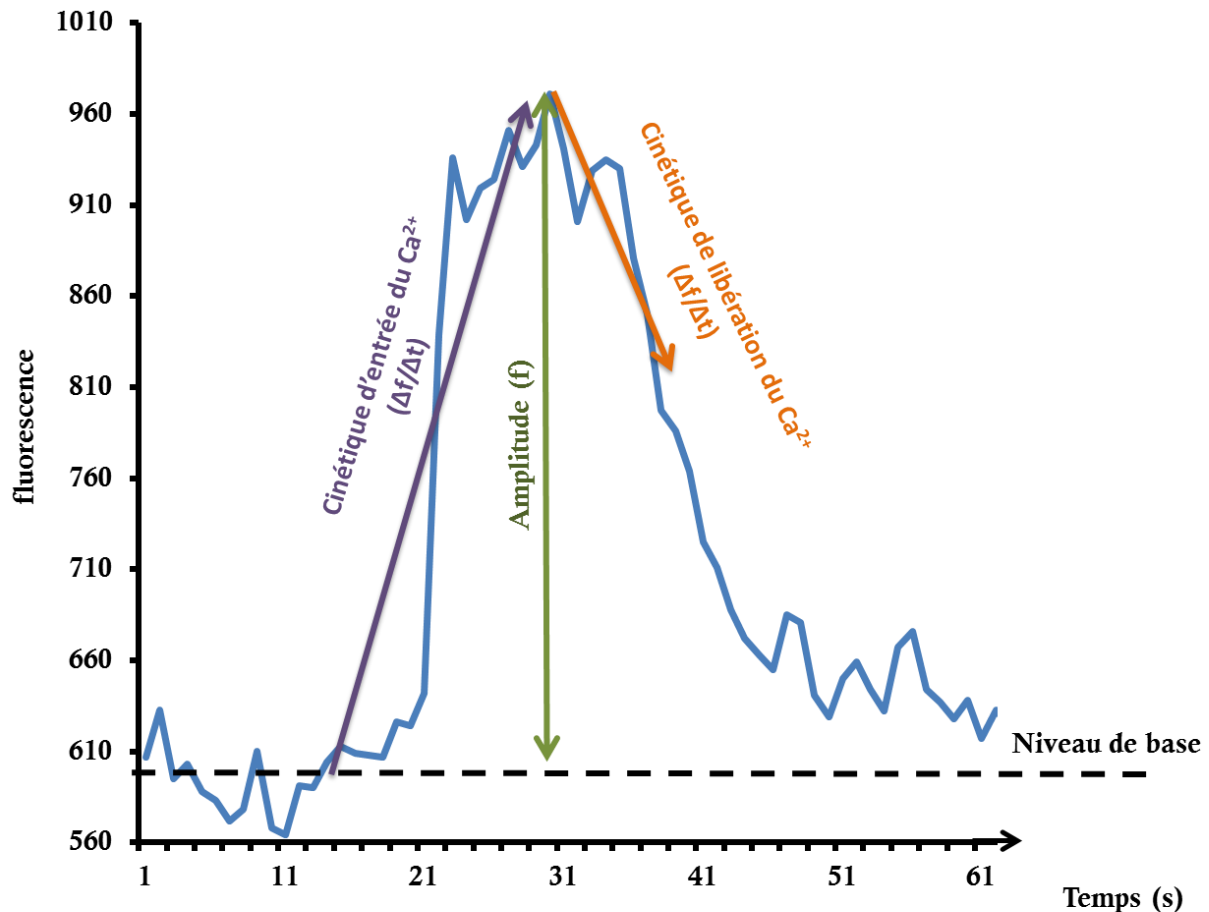


Figure II. 6 Exemple d'une réponse calcique suite à la dépolarisation de la membrane d'un cardiomyocyte marqué au FLUO chez *Nothobranchius furzeri*. Les différentes variables qui ont été estimées sont 1) l'amplitude du calcium impliqué dans la contraction du cardiomyocyte, 2) la cinétique de l'entrée de calcium, et 3) la cinétique de la sortie de calcium.

2.3 Mesure du métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique a été mesuré en suivant un protocole non invasif pour chaque température et à différents stades de vie : 5 et 7 semaines représentant le stade juvénile ; 12, 18 et 24 semaines pour le stade adulte ; et enfin 30, 36 et 42 semaines pour le stade sénescence (Chapitre 3). Le métabolisme énergétique a été estimé pour chaque individu à travers la mesure du taux métabolique standard (SMR), maximal (MMR), et la capacité métabolique (AS), par la mesure de la consommation d'oxygène (MO_2) réalisée grâce à des respiromètres à flux intermittent (Steffensen, 1989). Les respiromètres

avaient des volumes allant de 60 à 174 mL, adaptés aux individus en fonction de leur taille. Un nombre similaire de mâles et de femelles a été testé.

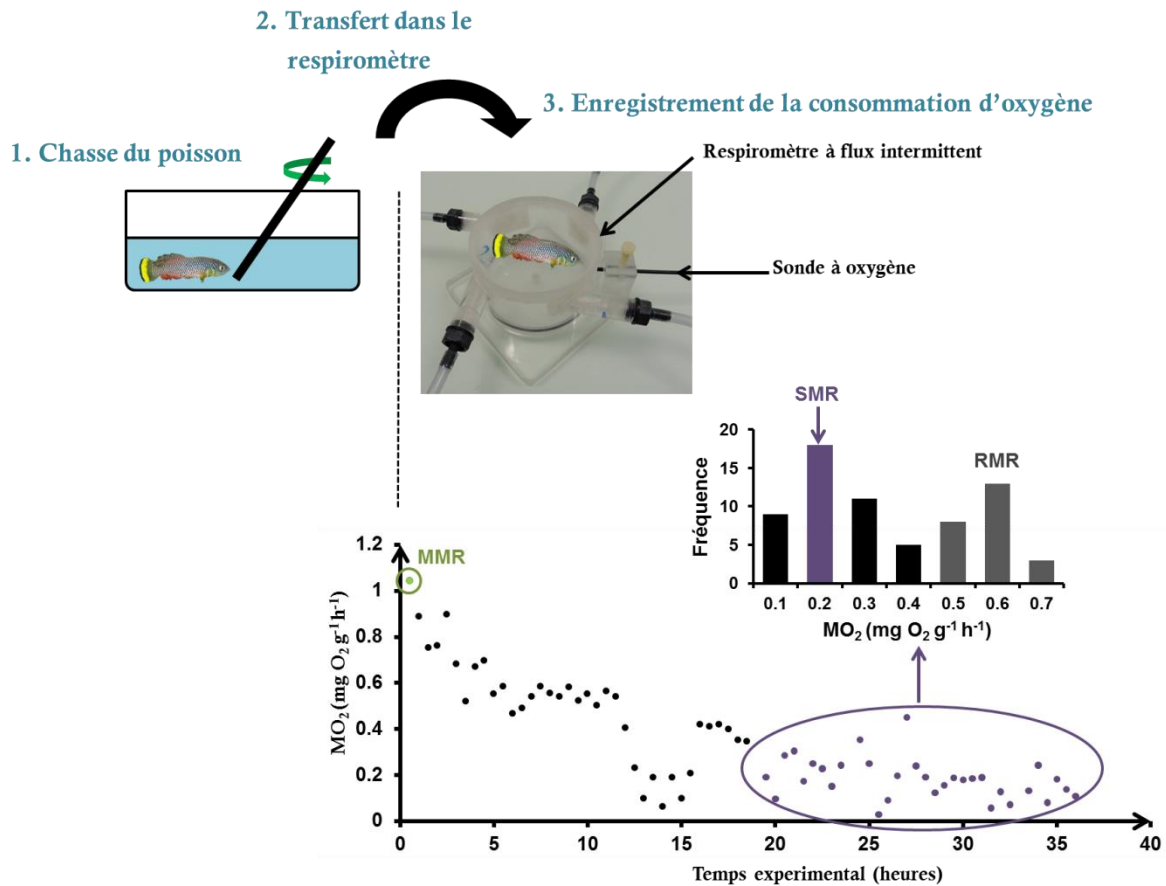


Figure II. 7 Exemple de consommation d'oxygène d'un individu *Nothobranchius furzeri* (mg O_2 g⁻¹ h⁻¹) ayant été préalablement chassé jusqu'à épuisement, puis placé dans un respiromètre à flux intermittent pendant 36 h. La donnée correspondant au taux métabolique maximal (MMR) est entourée en vert. Les données utilisées pour calculer le taux métabolique standard (SMR) sont entourées en violet. L'histogramme de fréquence de l'ensemble de ces données suivent une distribution bimodale, dont est issue la valeur de SMR (barre violette), ainsi qu'un ensemble de valeurs correspondant au métabolisme de routine (RMR ; barres grises).

2.3.1 Détermination du MMR

Chaque poisson, à jeun depuis 24 h, était préalablement stressé par une chasse manuelle jusqu'à épuisement puis transféré immédiatement dans un respiromètre (Schurmann & Steffensen, 1997 ; Clark *et al.*, 2013). Les individus étaient considérés comme étant épuisés lorsqu'ils arrêtaient de fuir face à la chasse (*i.e.* environ 3 min de chasse nécessaire

pour cette espèce). La MO_2 maximale mesurée suite à cette chasse était considérée comme représentative du taux métabolique maximal de l'animal (Clark *et al.*, 2013; Reidy *et al.*, 1995).

2.3.2 Détermination du SMR

Le SMR a été obtenu à partir des MO_2 enregistrées chez des individus au repos et à jeun (Fry, 1971). Cependant, ce type de mesure aboutit le plus souvent à une large gamme de valeurs de consommation d'oxygène. Cette dispersion est la conséquence de sursauts de l'activité spontanée du poisson, induisant une élévation de la demande en oxygène par les tissus. Ces augmentations de la consommation d'oxygène ne doivent cependant pas être incluses dans la détermination du métabolisme standard. Afin de pallier à ce problème, le SMR a été estimé via la méthode décrite par Steffensen *et al.* (1994) selon laquelle ce taux métabolique est évalué à partir d'un histogramme de fréquence (Figure II. 7). La distribution de fréquence des MO_2 est le plus souvent bimodale : un important pic de distribution correspond au taux métabolique standard et le second pic de distribution correspond à la MO_2 de routine.

2.3.3 Détermination de l'AS

Pour chaque individu, l'AS a été déterminé par la mesure de la différence entre le SMR et le MMR.

2.3.4 Mesure du taux relatif à la SDA

L'ensemble des coûts énergétiques impliqués dans l'ingestion, la digestion, l'absorption et l'assimilation des aliments est caractérisé par l'action spécifique dynamique, ou SDA (Jobling, 1994 ; Secor, 2008). Ainsi, la SDA correspond à l'augmentation significative du

taux métabolique faisant suite à l'ingestion de nourriture (Tandler & Beamish, 1979 ; Jobling, 1982). Afin de la mesurer, les poissons à jeun étaient placés dans des respiromètres à flux intermittent modifiés permettant la distribution de nourriture (Figure II. 8, Chapitre 4). Les poissons testés étaient nourris directement dans les respiromètres 20 h après le début de l'expérimentation, afin de s'assurer que leur taux métabolique était au SMR. Leur consommation d'oxygène était mesurée au cours des 20 h précédant la prise alimentaire, puis pendant les 16 h suivantes.

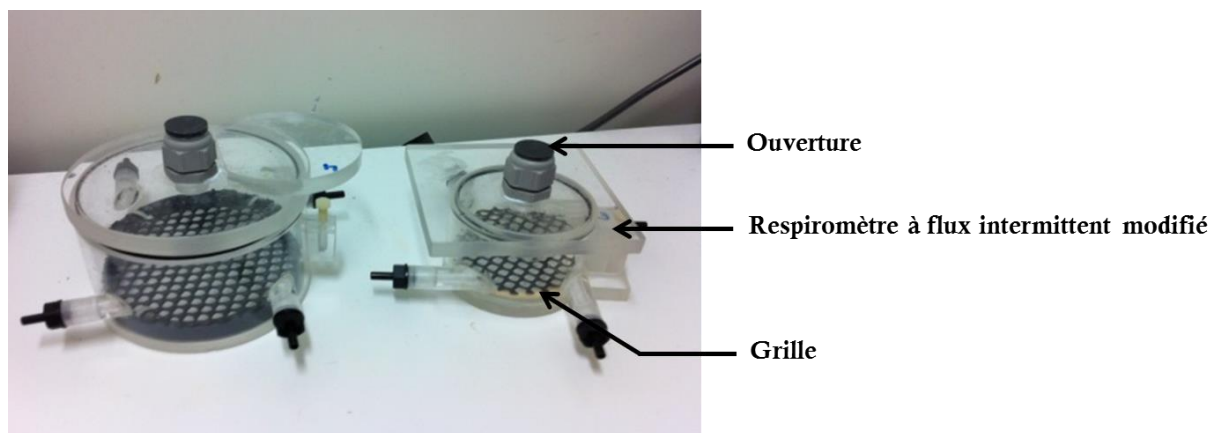


Figure II. 8 Respiromètre à flux intermittent modifié afin de permettre l'alimentation des poissons. Un bouchon en silicone amovible permet d'y introduire les chironomes, tout en gardant l'étanchéité du respiromètre une fois fermé. Une grille positionnée à 2 cm au fond des respiromètres permettait d'isoler les vers non ingérés des poissons.

La consommation d'oxygène postprandiale d'un poisson en fonction du temps (Figure II. 9) est caractérisée par une augmentation rapide de la MO_2 jusqu'à une valeur maximale (pic de MO_2). Puis la MO_2 diminue progressivement jusqu'à atteindre la valeur initiale observée durant la période de jeûne (SMR). La SDA représente la réponse métabolique postprandiale. Elle est caractérisée par sa durée, son pic, son amplitude et son ampleur (*i.e.* la quantité totale d'oxygène consommée pendant toute la durée de la digestion ; Jobling, 1981 ; McCue, 2006).

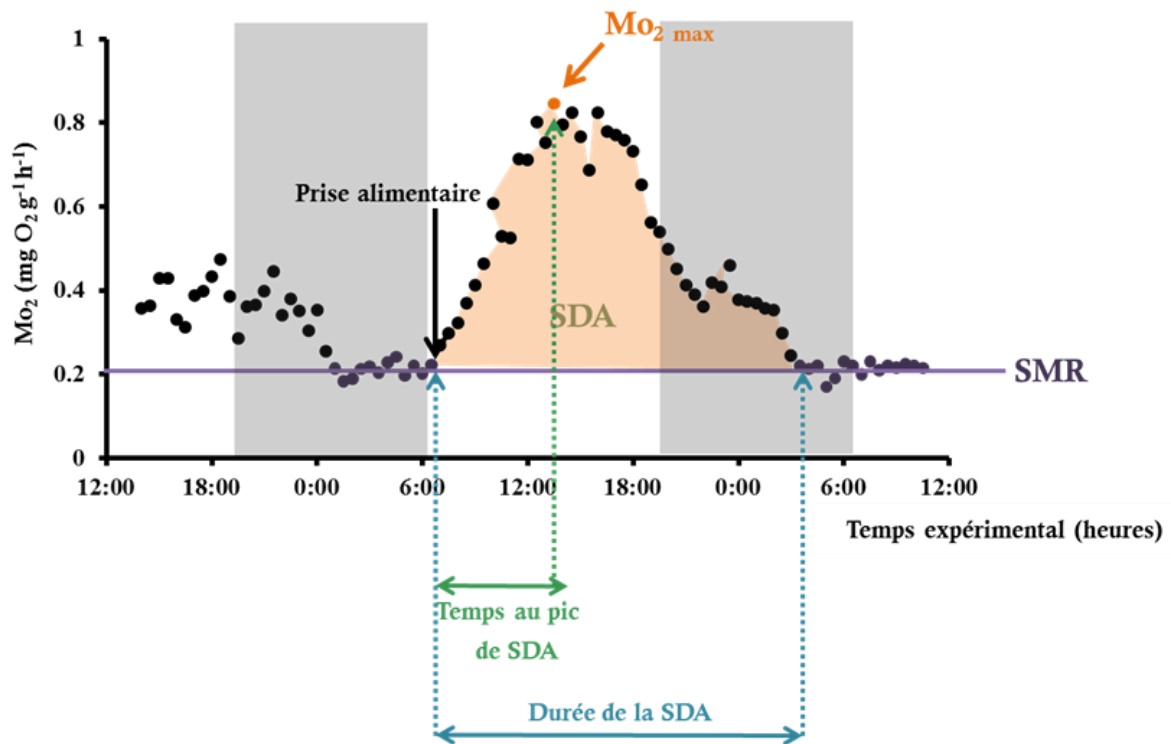


Figure II. 9 Analyse graphique de la SDA. La magnitude de la SDA est représentée en rose-orangé. Le $MO_{2\max}$ représente la valeur maximale de MO_2 atteinte durant la SDA, à laquelle est soustraite la valeur de SMR (représentée par un trait violet). La SDA est également caractérisée par sa durée et par le temps entre la prise de nourriture et la $MO_{2\max}$. Les points bleus représentent les moments où le poisson était en SMR. Les bandes verticales grises correspondent aux nuits et les blanches aux journées.

2.3.5 Mesure des performances de nage aérobique

En plus du coût lié à la digestion, le coût énergétique de la locomotion a été étudié par respirométrie, en mesurant la consommation d'oxygène (MO_2) d'un poisson soumis à un test d'effort dans un tunnel de nage. Le tunnel de nage utilisé est dérivé de celui décrit par Brett (1964 ; Figure II. 10, Chapitre 4). C'est un système fermé de 1500 mL dans lequel le courant d'eau est généré par la rotation d'une hélice entraînée par un moteur à vitesse variable. La vitesse du courant est contrôlée par la vitesse de rotation de l'hélice. Le poisson est placé dans la chambre de nage délimitée par un système de nid d'abeille en amont et en aval du courant. Le nid d'abeille permet de générer un flux laminaire d'eau à l'intérieur de cette chambre. Le poisson s'oriente spontanément de manière à nager face

au courant. De cette manière, il est possible de contrôler la vitesse de nage du poisson en faisant varier la vélocité du courant.

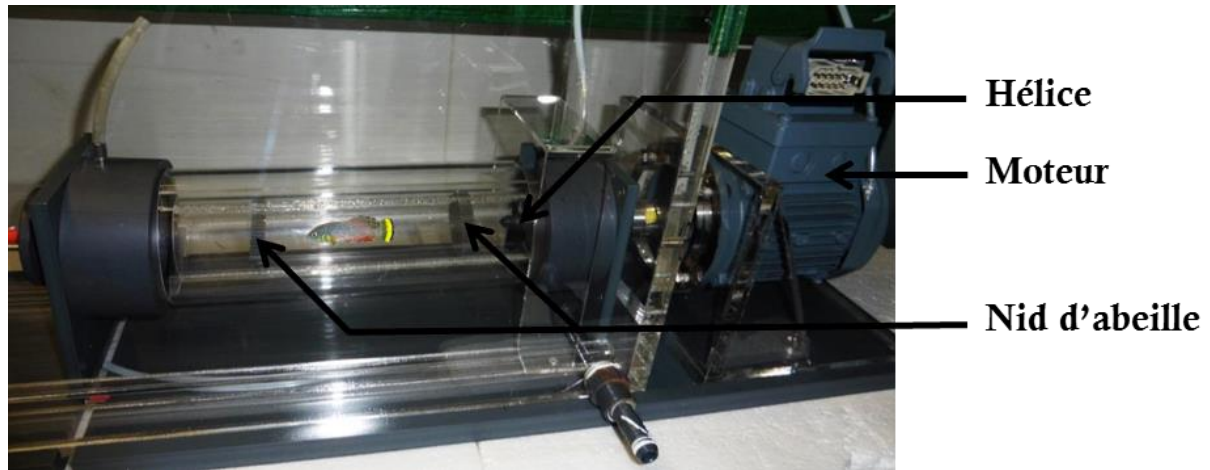


Figure II. 10 Tunnel de nage permettant d'enregistrer la MO_2 et la vitesse de nage critique au cours d'un test de nage.

Le test de nage consiste à augmenter progressivement, par palier de vitesse et de temps (ici + $0,5 \text{ BL.s}^{-1}$ toutes les 25 minutes), la vitesse du courant. Ce test a pour objectif d'amener l'animal à sa vitesse de nage maximale (Brett, 1964), appelée plus spécifiquement vitesse de nage critique (U_{crit}) pour ce type de challenge. Les poissons sont considérés comme ayant atteint leur U_{crit} lorsqu'ils ne sont plus capables de maintenir leur position dans le tunnel. Le tunnel de nage est un système qui peut être hermétiquement clos permettant de mesurer la consommation d'oxygène des individus. Lors d'un test de nage, la MO_2 augmente en fonction de la vitesse de nage du poisson (Figure II. 11), jusqu'à atteindre la $MO_{2\text{max}}$, concomitante à sa vitesse maximale de nage (U_{crit} ; Brett, 1964).

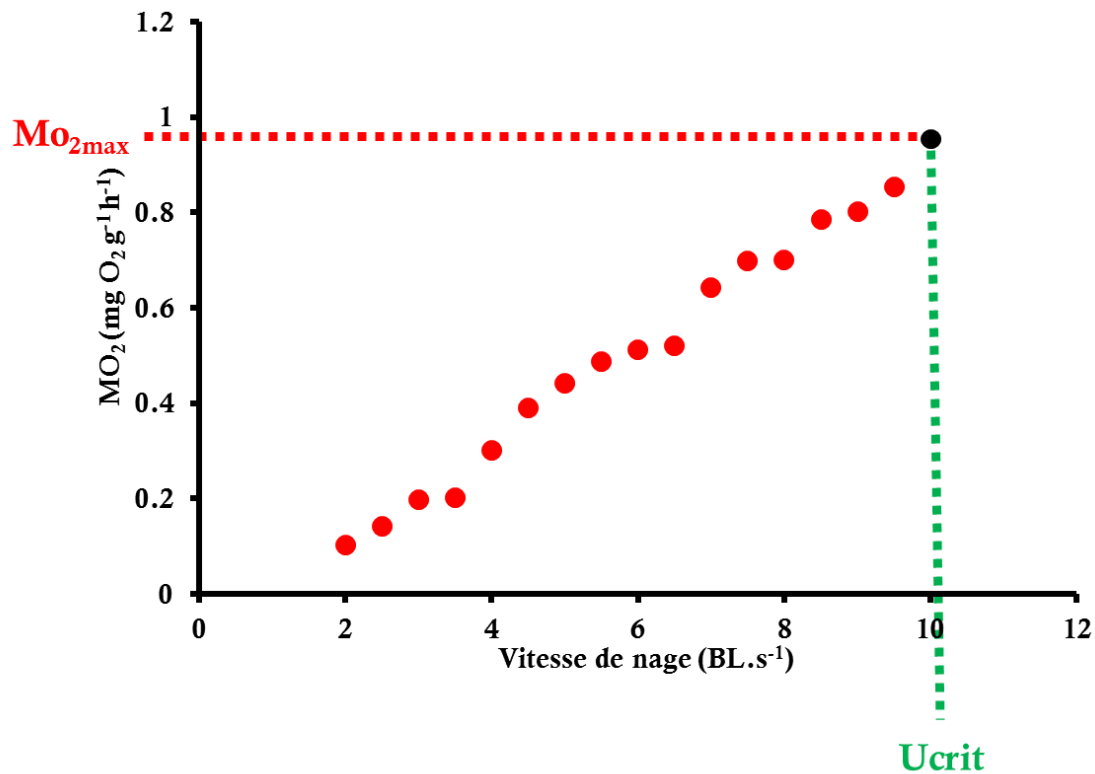


Figure II. 11 Exemple de la consommation d'oxygène en fonction de la vitesse de nage. La consommation d'oxygène augmente avec la vitesse de nage jusqu'à atteindre une valeur maximale MO_{2max} quand le poisson atteint sa vitesse de nage critique (U_{crit} ; en longueur corporelle par seconde ou BL.s⁻¹)

Ce chapitre avait pour objectif de décrire et d'illustrer les méthodologies générales qui ont été employées au cours de ce travail de thèse. Toutefois, des approches spécifiques vous seront présentées dans la partie Matériels et Méthodes de chacun des chapitres qui suivent.

CHAPITRE 3 :

CAPACITE METABOLIQUE AU COURS DE

LA VIE DE *NOTHOBRANCHIUS FURZERI* :

RÔLE REGULATEUR DE LA TEMPERATURE

Dans ce chapitre, je me suis intéressée aux variations des capacités métaboliques au cours de la vie (*i.e.* du stade juvénile au stade sénescence) de *Nothobranchius furzeri* acclimaté à deux températures, 22 et 26°C. Le rôle régulateur de la température a été exploré au travers de l'influence de ce traitement antvieillescence sur la relation entre la capacité métabolique et l'âge. Ce troisième chapitre est composé d'un article actuellement soumis sous forme de « short communication » à « *Experimental Gerontology* », précédé d'une introduction en français, et suivi d'une synthèse des principaux résultats obtenus.

Préambule

Lors du processus de vieillissement, les organismes subissent de progressives dégradations physiologiques et anatomiques. Ces dommages entraînent une baisse de la fitness, conduisant, avec l'âge, à une augmentation des maladies, aboutissant à la mort des individus à plus ou moins long terme (Kirkwood & Austad, 2000). La capacité métabolique aérobie (AS) correspond à la capacité globale d'un organisme, à un moment et dans des conditions environnementales données, à approvisionner les tissus en oxygène afin de produire l'énergie sous forme d'ATP nécessaire à l'ensemble des fonctions physiologique de l'animal (Fry, 1971 ; Killen *et al.*, 2011). Ainsi, l'AS de l'individu représente son énergie potentiellement disponible pour réaliser l'ensemble de ses activités, telles que la croissance, la digestion, la locomotion, la reproduction, etc. (Fry, 1971 ; Claireaux & Lefrançois, 2007 ; Chabot & Claireaux, 2008 ; Pörtner & Farrell, 2008). Bien que la capacité métabolique soit une composante clé pour la fitness d'un organisme, sa variation au cours d'un cycle de vie (du stade juvénile au stade sénescence), ainsi que la longévité qui lui est associée, n'ont toujours pas fait l'objet d'étude. De précédents travaux ont exploré le lien entre le métabolisme standard (SMR), maximal (MMR), ou

de routine (RMR) et la longévité ; cependant, les résultats obtenus sont contradictoires. Ceci pourrait être en partie dû au fait que ces taux métaboliques sont hautement variables en fonction du niveau d'activité de l'individu étudié. Afin de lever ce point de blocage, nous allons caractériser dans ce chapitre, le lien existant entre vieillissement et AS, en tant que mesure intégrative représentant le potentiel aérobie de l'organisme (Fry, 1971 ; Pörtner & Farrell, 2008). Plus précisément, différentes questions seront abordées : 1) La capacité métabolique décline-t-elle avec l'âge, où existe-t-il un âge métabolique optimal, associé à une AS maximale ? 2) Dans quelle mesure la relation entre l'AS et l'âge est-elle régulée par la réduction de la température ? Afin de répondre à ces différentes interrogations, la capacité métabolique a été mesurée tout au long de la vie de *Nothobranchius furzeri*, acclimaté à deux températures.

Aerobic scope follows a bell-shaped curve across lifespan in a short-lived vertebrate

Marie Durollet^{1,*}, Paolo Domenici², Alessandro Cellerino^{3,4}, Christel Lefrançois¹

¹Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS - Université de La Rochelle, La Rochelle, France

²Istituto per l'Ambiente Marino Costiero, CNR-IAMC, Località Sa Mardini, Torregrande (Oristano), Italy

³Scuola Normale Superiore, Pisa, Italy

⁴Biology of Aging, Fritz Lipmann Institute for Age Research - Leibniz Institute, Jena, Germany

*Author for correspondence (marie.durollet@univ-lr.fr)

Keywords: Aging; Aerobic scope; Optimal age; *Nothobranchius furzeri*

Abstract

Aerobic scope is the capacity of an organism to increase its oxygen consumption rate from resting to a maximal status. It represents the potential energy available to sustain an organism's activities, including locomotion, digestion and growth. Despite the fact that aerobic scope is a key component of an organism's fitness, its relationship with aging remains surprisingly unexplored. Using *Nothobranchius furzeri* (the shortest-lived vertebrate that can be cultivated in captivity), we show that (a) the aerobic scope follows a bell-shaped curve over its lifespan, and (b) life-extension by temperature reduction is accompanied by a decrease of aerobic scope, and a delay of its peak (the optimal age). These results suggest that the pattern of aerobic scope and its decay may be a major determinant of aging in vertebrates. They highlight for the first time the relationship between metabolic capacities and aging, as well as the effect of temperature as a modulating factor.

3.1 Introduction

Aging is accompanied by progressive physiological and anatomical deteriorations, causing a reduction of fitness that translates into an age-dependent increase in incidence of diseases and mortality (Kirkwood & Austad, 2000). Aerobic scope is the capacity of an organism to increase oxygen consumption rate from resting to a maximal status, in order to sustain activities, including locomotion, digestion and growth (Fry, 1971; Pörtner & Farrell, 2008). Despite the fact that aerobic scope represents the energy potential of an organism and is, therefore, a key component of its fitness, its relationship with aging remains unexplored. Previous studies have investigated the effect of aging on aerobic metabolic rate, yielding contradictory patterns. This discrepancy could be partly attributed to the fact that various types of aerobic metabolic rates were measured, such as standard metabolic rate (*i.e.* the minimal level of oxygen supply necessary to maintain vital activities, Rønning *et al.*, 2014), routine metabolic rate (*i.e.* the metabolism during spontaneous activity, Chappell *et al.*, 2003), and maximum metabolic rate (Speakman *et al.*, 2004). The animal physiological status indeed oscillates between these three specific metabolic rates, due to fluctuating activity levels that may, in turn, be affected by aging, thereby confounding the analysis. To overcome this bottleneck, aerobic scope offers an ‘integrative gauge’ which represents the potential energy available to sustain activities (Fry, 1971; Claireaux & Lefrançois, 2007; Pörtner & Farrell, 2008). Therefore, our analysis is based on assessing the relationship between aerobic metabolic scope and aging. Specifically, we address the following questions: (1) does aerobic scope decline following a monotonic decay or is there an ‘optimal age’ associated with maximum aerobic scope? (2) does the pattern of aerobic scope relate to animal lifespan? (3) how is this pattern influenced by aging-regulator factors, such as temperature? To investigate

these questions, we measured the lifetime dynamics of aerobic scope (from juvenile to senescent stages) throughout the lifecycle of the fish *Nothobranchius furzeri*, the shortest-lived vertebrate that can be cultivated in captivity (Terzibasi *et al.*, 2007; Cellerino *et al.*, 2015) at two different temperatures.

3.2 Material and methods

Nothobranchius furzeri of the strain MZM 0410 (Cellerino *et al.*, 2015) were bred in LIENSs laboratory (Coast Environment & Societies laboratory, La Rochelle, France), where the complete life cycle of this species is mastered. At 10 days post hatching, groups of about 25 individuals were transferred to rearing aquaria where they were acclimatized at 25.6 ± 0.5 °C, considered as the optimal temperature for this species (Cellerino *et al.*, 2015), or 22.1 ± 0.8 °C, which is the lowest temperature allowing reasonable growth and reproduction in *N. furzeri* (Durollet, personal observations). For each temperature, three groups of fish were used to track survival rates. The dead fish from each group were tallied daily and removed from the rearing aquarium. Survival rate was calculated once a week.

Three other groups of individuals per temperature were used to investigate how aerobic scope changes with aging. Fish were tested at 5 and 7 weeks-old, to represent the juvenile stage; at 12, 18 and 24 weeks-old, to represent the adult stage; at 30, 36 and 42 weeks-old, to represent the senescent stage. Measurements were carried out in starved individuals and each individual was tested only once. For each experimental series, 8 size-adapted respirometers were used in parallel (diameter: 3.75 and 7.50 cm; volume: 0.06 and 0.18 l for juveniles and adults/senescent fish, respectively). Respirometers were submerged into

buffer tanks (four respirometers per buffer tanks; depth x length x height: 15 x 30 x 40 cm) and filled with temperature-controlled and oxygenated water. Oxygen consumption was measured by intermittent flow-respirometry where the water supply in each respirometer was provided by flush pumps controlled by a timer. This system allowed us to alternate phases of oxygen renewal with phases of oxygen consumption (MO_2) measurements following a period of 15:15 min. The set-up was completed by a multichannel peristaltic pump to create a continuous water flow and insure water mixing inside each of the chambers. To record the oxygen concentration in the water, each respirometer was equipped with an optic fiber sensor (Presens, Germany) connected to a multichannel oxygen measuring system (OXY 4 mini, Presens, Germany). Oxygen data were sampled each five seconds with the program Oxyview (PreSens, Germany).

At each age tested, one experimental trial consisted in the determination of both maximum (MMR) and standard metabolic rate (SMR), and lasted about 36h. For MMR assessment, fish were individually “chased” until exhaustion to increase their metabolism to its maximum (Clark *et al.*, 2013). Each fish was then immediately placed into a respirometer, and the oxygen consumption was immediately measured during 20 min. For SMR assessment, fish were kept inside the respirometers during the following next 36 hours at rest, without external disturbance or food. During this period, oxygen consumption measurements were automatically carried out two times per hour. To subtract the microbial oxygen consumption from the total oxygen consumption inside the respirometers, a 30 min blank measurement was performed before and after each experimental trial. The expected value of microbial oxygen consumption (assumed to be linear throughout the experiment; Steffensen, 1989, Lucas *et al.*, 2014), was subtracted from the corresponding total oxygen consumption measured. At the end of each

experimental trial, fish were anesthetized in order to measure their body-mass, before they were returned to rearing aquaria.

Data treatment consisted first in correcting fish oxygen consumption for size effects. To this end, an allometric relationship between oxygen consumption and body mass was employed, using the parameters determined in zebrafish *Danio rerio*, a similar size species (Lucas *et al.*, 2014b). Second, MMR was assessed as the maximal oxygen consumption of the two measured values in fish after being chased. Third, SMR was estimated from a frequency histogram of the oxygen consumption data collected when individuals had recovered from the chasing procedure (*i.e.* their oxygen consumption had stabilized; *c.f.* Chapter 2.3.2. Figure II. 7). This produces a bimodal distribution due to a possible spontaneous activity of the fish. Two normal curves were fitted to the oxygen consumption frequency histogram to separate the SMR peak from the peak of more elevated metabolism related to routine activity (Steffensen *et al.*, 1994). For each individual, aerobic scope was obtained as the difference between its MMR and its SMR.

For each measured variables, female and male data were confronted with statistical tests, which highlighted that there was no significant difference induced by sex in this species. Therefore, measurements in males and females have been pooled for the statistical tests presented afterwards. Data homoscedasticity was found to be respected for SMR, MMR and AS data. Therefore, two-way ANOVA was used to determine significant effect due to age and temperature ($p < 0.01$).

3.3 Results

The increased temperature induced a significant increase of age-dependent mortality in *Nothobranchius furzeri* (Figure 1A). The median lifespan was 37.5 and 32 weeks in 22 and 26°C-acclimated *N. furzeri*, respectively (Mantel-Cox test; $P < 0.001$). Temperature had no significant effect on SMR in *Nothobranchius furzeri* (Two-way ANOVA; Figure 2B). On the other hand, SMR was significantly impacted by age independently from the temperature (age effect: $P < 0.001$). Indeed, SMR tends to increase in aging (coefficient of determination; 22 °C: 0.391; 26 °C: 0.554).

A different pattern was observed for MMR, since it was significantly influenced by both age and temperature, without any observed interaction effect (Two-way ANOVA; age and temperature effects: $P < 0.001$; Figure III 2A). A similar tendency was observed for aerobic scope (Two-way ANOVA; age and temperature effects: $P < 0.001$; Figure III 1B).

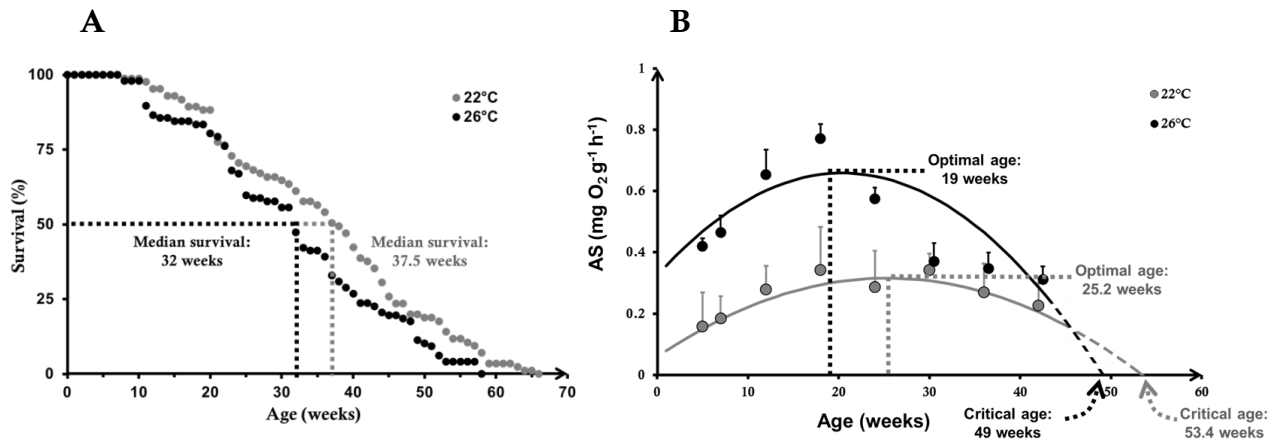


Figure III 1. **(A)** *Nothobranchius furzeri* survival depends on age in individuals acclimated to the two experimental temperatures (26°C: N = 102; 22°C: N = 85, sex-ratio $\approx 1:1$). Ages at which median survival is reached (*i.e.* at which 50% of mortality occurred) are indicated by dotted lines. **(B)** Aerobic scope (AS, mean \pm SE) of *Nothobranchius furzeri* (26°C: N = 86; 22°C: N = 80, sex-ratio = 1:1) as a function of age at the two experimental temperatures. Polynomial regressions are represented by curves with equations: (1) for 22°C: $AS = -0.0004 \cdot \text{age}^2 + 0.0203 \cdot \text{age} + 0.0579$ (regression p-value = 0.666×10^{-3}); (2) for 26°C: $AS = -0.0004 \cdot \text{age}^2 + 0.0203 \cdot \text{age} + 0.0579$ (regression p-value = 0.666×10^{-3}).

= $-0.0008 \cdot \text{age}^2 + 0.0327 \cdot \text{age} + 0.3244$ (regression p-value = 0.485×10^{-2}). Solid lines correspond to these equations plotted over the range of the ages tested; dotted lines represent expected AS on extrapolated ages. Age_{opt} was determined based on the derivative $\partial y / \partial x$ of the equation, which equals zero when y attains its maximum. Age_{crit} corresponds to the age at which AS equals to zero. Age_{opt} estimated by these models was 25.2 weeks for the 22°C-acclimated fish, while it was 32 % lower for the 26°C-acclimated fish; *i.e.* 19 weeks. Regarding Age_{crit} , a difference of 12 % was observed; Age_{crit} was 49 weeks and 53.4 weeks at 22 and 26°C, respectively.

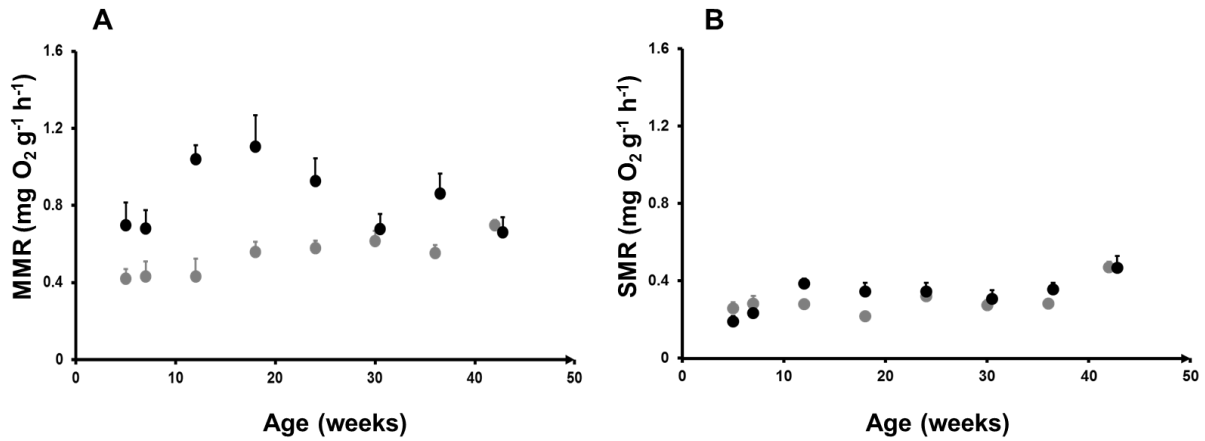


Figure III 2. (A) Maximum metabolic rates (MMR, mean \pm SE) and (B) Standard metabolic rates (SMR, mean \pm SE) of *Nothobranchius furzeri* as a function of age at the two experimental temperatures, 22°C and 26°C.

At each experimental temperature, a bell-shaped pattern was observed over the lifecycle of *Nothobranchius furzeri*, which suggested the existence of an ‘optimal age’ associated with a maximum of aerobic scope. Fitting a quadratic model allowed a more accurate description of this pattern. The following equation was therefore employed, since it allows the best data fit compared to a cubic equation (Shapiro-Wilk normality test; at 26 °C, and 22 °C: $P < 0.001$):

$$\text{Aerobic scope} = a \cdot \text{age}^2 + b \cdot \text{age} + c \quad \text{equation (1)}$$

Where aerobic scope is in $\text{mg O}_2 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$, age in weeks and a , b and c are three constants.

The model was used to assess the optimal age (Age_{opt}), as well as a critical age (Age_{crit}), *i.e.* the age at which aerobic scope is equals to zero (Figure III. 1B). Age_{opt} estimated by these models was 25.2 weeks for the 22°C-acclimated fish, and 19.0 weeks for the 26°C individuals, *i.e.* 25% lower. Regarding age_{crit} , it was estimated at 53.4 weeks and 49.0 weeks at 22 and 26°C, respectively, *i.e.* 8% lower.

3.4 Discussion

The aim of this study was to explore the variation of aerobic metabolic scope along the life cycle of *Nothobranchius furzeri* and the consequences of a temperature reduction on the aging-related changes, which, as demonstrated previously by Valenzano *et al* (2006), induced an increase of longevity in *N. furzeri* (Figure III. 1A).

MMR and SMR were both significantly impacted by age (Figure III. 2A & B) and resulted in the pattern of a bell-shaped curve followed by the aerobic metabolic scope (Figure III. 1B).

The initial elevation of both MMR and AS may have resulted from the progressive maximization of the mitochondrial energy production sustaining the increasing energetic demands related to the intense growth, gonad maturation and subsequent reproduction, typically observed in young individuals (Rea *et al*, 2007). Beyond this phase, decreasing aerobic scope may be partially due to the loss and progressive impairment of the functionality of mitochondria caused by aging (Hartmann *et al.*, 2011). This deterioration contributes to decreasing the capacity to aerobically produce ATP (Phillips *et al.*, 2000). Thus, the progressive reduction in aerobic scope may be synonymous with the beginning of the senescent stage.

Interestingly, it should be noted that the aerobic scope of individuals that survived beyond the median lifespan of the 26°C-acclimated fish (*i.e.* 32 weeks) tends to plateau (Figure III. 1B). These individuals may represent a selected population of higher longevity, which possesses an optimized phenotype regarding the aging processes. Their aerobic scope may represent a low metabolic bound below which animals cannot survive because they are unable to sustain routine activities.

The bell-shaped curve pattern of AS allowed the assessment of optimal age (Age_{opt}) and critical age (Age_{crit}) at each temperature. A temperature-dependent delay in both Age_{opt} and Age_{crit} was observed in accordance with the shift in median and maximum lifespans (Figure III. 1B). In particular, Age_{opt} was delayed at 22°C compared to 26°C; at this temperature, *Nothobranchius furzeri* reached their maximal aerobic scope 6.2 weeks later than the 26°C-acclimated individuals. The temperature-dependant effect on AS could be due to the decrease of cellular respiration, which would reduce the production of reactive oxygen species and associated damage. Indeed, it was reported that, in *N. furzeri*, low temperature reduces the accumulation of lipofuscin which is a neutral marker of lipid peroxidation (Valenzano et al., 2006). Therefore, we could expect reduction in cellular damages in general, which is likely to participate to (i) the temperature-related delay and slowing-down of the aerobic scope decline observed in aging *N. furzeri*, as well as (ii) the increased lifespan at lower temperatures. From a wider perspective, variations in aerobic scope with temperature and/or aging illustrate dissimilarities in potential for ATP production (Pörtner & Farrell, 2008), and thus a modification of the capacity to accomplish activities, including locomotion, but also growth and reproduction (Fry, 1971, Pörtner & Farrell, 2008). Increasing longevity as a result of a reduction in temperature may therefore be detrimental for energy-demanding activities across the

lifecycle. This may in particular suggest a trade-off between the investment in growth, reproduction and longevity, which would lead to changes in the organism's fitness. Such a temperature-dependent trade-off was indeed already observed in the medaka *Oryzias latipes* by Hemmer-Brepson et al. (2014).

3.5 Conclusion

This study provides the first data on the temperature-dependent dynamics of aerobic scope across the lifecycle of a vertebrate organism. A particular and distinguishing feature of the age-related variation in aerobic scope is that an optimal age was found. Furthermore, temperature reduction, in addition to extending lifespan, leads to a concomitant delay of this optimal age. Our results introduce an innovative concept in aging research, based on a link that may exist between the optimal age of aerobic scope, aging and the expected lifespan of vertebrates.

Acknowledgements

This work was supported by ALIVE project (Ageing and functional integrity: modulation by LIfe-extending treatments in a VErttebrate model with extremely short lifespan). We thank E. Dubillot, M. Prineau and F.E. Vauchez for technical support.

Synthèse

Ce chapitre de thèse permet de mettre en évidence qu'une réduction de 4 °C de la température d'acclimatation a induit un accroissement de la longévité chez *Nothobranchius furzeri* ; la durée de vie moyenne de 32 semaines à 26 °C est augmentée à 37.5 semaines à 22 °C. Par ailleurs, quelle que soit la température d'acclimatation, la variation de la capacité métabolique au cours de la vie suit une forme caractéristique de courbe en cloche, ou courbe gaussienne. En effet, l'AS augmente au cours de la phase juvénile puis adulte, jusqu'à un âge métabolique optimal (ou Age_{opt}). Si la première phase d'augmentation des capacités métaboliques peut être attribuée à la maximisation progressive des mitochondries à produire de l'énergie, et ce afin de répondre aux besoins énergétiques accrus d'activités caractéristiques des jeunes individus, *i.e.* la croissance gonadique et somatique ; la deuxième phase correspondant à une réduction de l'AS peut être imputée à la détérioration et la perte progressive de mitochondries, causées par le vieillissement (Phillips *et al.*, 2000). Il en résulterait une baisse de la capacité à produire de l'ATP. Ainsi, cette réduction progressive de la capacité de l'organisme à produire de l'énergie serait concomitante à son entrée en phase de sénescence.

Enfin, ce travail a permis de mettre en évidence le rôle régulateur de la température. Tout en augmentant la longévité, la réduction de température décale l'âge métabolique optimal d'environ 6 semaines, retardant ainsi l'entrée en phase de sénescence chez les individus acclimatés à 22 °C. Le rôle régulateur de la température se traduit aussi par une tendance différente lors du déclin de l'AS au cours de la sénescence : l'altération des capacités métaboliques avec l'âge est ralentie chez les poissons acclimatés à faible température. Ainsi, chez les individus acclimatés à une température réduite, l'allongement de la durée

de vie moyenne s'accompagne d'un décalage de l'Age_{crit} (*i.e.* l'âge correspondant à une AS proche de zéro).

Cette étude apporte donc pour la première fois des données concernant l'effet de la température sur la variation de la capacité métabolique au cours de la vie d'un vertébré ; le résultat clé de cette étude étant l'existence d'un âge métabolique optimal. Enfin, la réduction de température, a décalé Age_{opt} d'une durée similaire à celle observée pour la longévité (*i.e.* de 6 semaines).

Etant donné que la capacité métabolique détermine la capacité d'un organisme à réaliser ses activités, il est fort probable que les variations de l'AS observées au cours du vieillissement se répercutent sur ses niveaux d'activités. De plus, la régulation par une réduction de température de la dynamique de l'AS au cours de la sénescence pourrait entraîner des modulations de la stratégie d'allocation énergétique, se répercutant sur la durée de vie des individus. Ces hypothèses font l'objet du prochain chapitre de cette thèse.

CHAPITRE 4 :

NIVEAUX D'ACTIVITES, VIEILLISSEMENT

ET VARIABILITE INTER-INDIVIDUELLE

Au cours de ce présent chapitre, ont été étudiées les variations des niveaux d'activités de reproduction, de croissance, de prise alimentaire, de digestion et de locomotion au cours du vieillissement de *Nothobranchius furzeri* acclimaté à deux températures, 22 et 26 °C. Un des objectifs de ce travail était d'explorer la dynamique de l'ensemble de ces activités chez des individus ayant été suivis à leur stade adulte et sénescant. Puis, ce travail avait également pour but de mettre en évidence le lien éventuel entre stratégie individuelle d'allocation énergétique et durée de vie des organismes. Ce chapitre est présenté sous la forme de deux articles. Le premier explore la relation existant entre la longévité des individus, la capacité métabolique et les activités de reproduction et de croissance. Il sera prochainement soumis au journal « **Journal of experimental biology** ». Le deuxième article s'attache à étudier l'effet du vieillissement sur les activités de digestion et de locomotion mise en place au cours du vieillissement. Cet article est présenté en français, et fera ultérieurement l'objet d'une soumission pour publication.

Préambule

Lors du précédent chapitre, nous avons mis en évidence que la capacité métabolique au cours de la vie de *Nothobranchius furzeri* suivait une courbe gaussienne, signifiant ainsi la présence d'un âge métabolique optimal. De plus, une réduction de la température d'acclimatation des individus, non seulement accroît leur durée de vie, mais décale aussi l'âge métabolique optimal tout en ralentissant le déclin de la capacité métabolique au cours de la sénescence. Or, la capacité métabolique représente la quantité d'énergie dont dispose les individus pour réaliser l'ensemble de leurs activités discrétionnaires, telles que la locomotion, la digestion, la reproduction, etc... Le déclin des capacités métaboliques au cours de la sénescence s'accompagne donc probablement de modulations des niveaux

d'activités participant aussi à la réduction de la demande énergétique à laquelle doit répondre l'organisme. Deux cas de figures sont généralement possibles : soit les organismes réduisent l'ensemble de leurs niveaux d'activités, soit une stratégie d'allocation énergétique privilégiant telle ou telle activité se met en place (Alsop & Wood, 1997 ; Thorarensen & Farrell, 2006 ; Jourdan-Pineau *et al.*, 2010). Chez les poissons acclimatés à température plus basse, la réduction de l'AS et le ralentissement de son déclin durant le vieillissement, pourraient induire la mise en place d'une stratégie d'allocation énergétique spécifique, participant potentiellement à un accroissement de la longévité observé à 22 °C chez *Nothobranchius furzeri*. En effet, d'après la théorie du 'rate of living' établie par Pearl (1928), plus le niveau d'activité d'un organisme est faible, plus son espérance de vie est supposé être longue comparativement à un individu ayant un niveau d'activité plus élevé. De nombreux auteurs ont repris cette théorie, et l'explique par le fait que de hauts niveaux d'activités requièrent une forte production énergétique via les processus métaboliques (Sohal, 1986 ; Biesmeijer & Tóth, 1998 ; Sgrò & Partridge, 1999 ; Metcalfe & Monaghan, 2003). Or, un métabolisme élevé produit une grande quantité de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), molécules toxiques accélérant le processus de vieillissement (*c.f.* théorie des radicaux libres, Chapitre 1.1.2 ; Harman, 1955, 1981, 1992 ; Ragland & Sohal, 1975 ; Sohal & Allen, 1986 ; Ku *et al.*, 1993 ; Ku & Sohal, 1993 ; Speakman *et al.*, 2002 ; Speakman, 2003, 2005). Dans ce contexte, un suivi de la longévité, de la capacité métabolique et d'un ensemble d'activités (*i.e.* reproduction, croissance, locomotion, digestion, prise alimentaire) au cours des stades adultes et sénescents a été réalisé.

Trois hypothèses ont été testées au cours de ce travail :

- La diminution des capacités métaboliques au cours de la sénescence s'accompagne d'un déclin de l'ensemble des activités discrétionnaires des individus
- La réduction de la température ralentit le déclin observé sur l'ensemble des activités suivies
- Les individus ayant les niveaux d'activités les plus élevés pendant leur stade adulte présentent un déclin plus important au cours de leur stade sénescence, ainsi qu'une mortalité précoce.

Chapitre 4 - Partie 1 :
Temperature and activity level in aging
Nothobranchius furzeri

Temperature and activity level in aging

Nothobranchius furzeri

Marie Durollet^{1*}, Morten Bo S. Svendsen², Julie Lucas¹, Thibaut Charmoille¹, Adrien Inacio¹, Léa Kayser¹, Emmanuel Dubillot¹, Christel Lefrançois¹

¹Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS - Université de La Rochelle, La Rochelle, France

²Marine Biological Laboratory, University of Copenhagen, Helsingør, Denmark

*Author for correspondence (marie.durollet@univ-lr.fr)

Keywords: Aerobic metabolic capacity, reproduction, growth, aging, lifespan,

Nothobranchius furzeri

Abstract

We investigated the dynamic of growth and reproduction effort over *Nothobranchius furzeri* lifespan. To emphasize the link between energy expenditure and longevity, an individual monitoring of metabolic capacities & reproduction efficiency was performed at adult and senescent stage. We demonstrated that females eggs production follow a bell shape curve over *Nothobranchius furzeri* lifespan. Individual monitoring revealed that 1) males present a decrease on their efficiency to fertilized eggs without reducing their mating interaction with the female; and 2) a trade-off between eggs number and size existed in aging *Nothobranchius furzeri*. Then, we did not observe any relationship between AS nor activity and inter-individual longevity.

4.1 Introduction

Advancing age is accompanied by time-related deteriorations of the physiological functions, leading to an increase of diseases and mortality (Harman, 1981 ; Kirkwood & Austad, 2000). Despite recent advances in molecular biology and genetics, the complex processes that control lifespan are yet to be unraveled. Many theories (around 400; Weinert & Timiras, 2003) have tried to explain the process of aging, but neither of them allows to unequivocally explain the all phenomena that are involved.

Among the most accepted theories, some involved the metabolism as a key actor in aging process. The older one is the 'rate-of-living' theory, initiated by Rubner's work (Rubner, 1908). He suggested that the total lifetime caloric consumption is relatively constant for all species. Caloric consumption is closely related to the organism activities, and therefore to the rate of metabolic processes which sustain energy production. Thus, animals living at a faster activity rate are expected to have a shorter lifespan in comparison with those who would show less energy demanding activities (Sohal, 1986 ; Biesmeijer & Tóth, 1998 ; Sgrò & Partridge, 1999 ; Metcalfe & Monaghan, 2003). In 1928, Pearl supplemented this theory by proposing to focus on a particular metabolic rate: he suggested that longevity varies inversely with basal metabolic rate, *i.e.* the minimal metabolic rate necessary to maintain mechanisms involved in vital functions, such as cardiac contraction. Metabolism was also identified as an actor in aging process through the free radical theory of Harman (1955): oxidative metabolism leads to the production of metabolic toxic by-products, the reactive oxygen species (ROS), which impair lipids, proteins and DNA integrity (Harman, 1955, 1981, 1992 ; Beckman & Ames, 1998 ; Sohal, 2002 ; Sohal *et al.*, 2002). Thus, even if some of these theories are contested, a faster rate of aerobic metabolism would be associated with a greater

generation of oxygen radicals, and would, thereby, also hasten aging (Finkel & Holbrook, 2000).

Aerobic metabolic scope (AS) is the capacity of an organism to increase its oxygen consumption rate from a resting to a maximal status. AS is related to the capacity of an individual to transport the oxygen. AS therefore supports oxygen-demanding activities, and was associated by the energy potential of an organism (Fry, 1971 ; Priede, 1985 ; Claireaux & Lefrançois, 2007 ; Chabot & Claireaux, 2008 ; Pörtner & Farrell, 2008 ; Clark *et al.*, 2013). Activities include not only mechanical work, such as muscle contraction, but also growth, physiological regulations to maintain homeostasis or fighting diseases (Fry, 1971 ; Priede, 1985 ; Claireaux & Lefrançois, 2007 ; Chabot & Claireaux, 2008 ; Pörtner & Farrell, 2008 ; Clark *et al.*, 2013). Any variation of AS is likely to induce modifications in energy allocation between all these activities (Priede, 1985 ; Evans, 1990 ; Jourdan-Pineau *et al.*, 2010); AS is therefore considered as a good proxy for assessing organism performance and fitness (Priede, 1985 ; Claireaux & Lefrançois, 2007 ; Pörtner & Farrell, 2008). Increasing AS was for instance found to be correlated with an elevation in somatic and gonadic growth in various species of teleost (Dabrowski, 1985 ; Claireaux *et al.*, 2000 ; Mallekh & Lagardère, 2002 ; Claireaux & Lefrançois, 2007 ; Del Toro-Silva *et al.*, 2008). In a short-lived vertebrate, *Nothobranchius furzeri*, Durollet *et al.* (2015, *submitted*) demonstrated that AS followed a bell-shaped curve over its life cycle. Moreover, they highlighted that this relationship was affected by a temperature reduction. In addition to decrease AS, as observed in various fish species (Claireaux *et al.*, 2000 ; Pörtner, 2001 ; Pörtner & Knust, 2007), cold temperature delayed and slowed-down the AS decline observed in aging individuals. This temperature-related reduction in AS was accompanied by an increasing lifespan. These observations raise 2 questions: (1) To which extent temperature and age-related reduction in AS leads to

differences in activities in *N. furzeri*? (2) Are inter-individual variations in AS and/or activities investment related to differences in longevity? We could indeed expect that individuals with higher energy-demanding activities at adult stage will produce more ROS. This would participate to damage cells, and may influence the resource allocation while aging; these individuals may show a faster decline due to senescence.

Although the relationship between activity level of an organism and its lifespan has been already explored, it is still subject to controversy. Indeed, in accordance with the “rate-of-living” theory, it was observed in the fruit fly *Drosophila melanogaster* that more performant is the reproduction, shorter is the lifespan (Lamb, 1964 ; Partridge & Farquhar, 1981 ; Rose & Charlesworth, 1981 ; Partridge & Fowler, 1992 ; Sgrò & Partridge, 1999). Similar observations have been made in the mosquito *Anopheles gambia* (Dao *et al.*, 2010). A rapid growth has also been associated to a reduction in lifespan in various species (Metcalf & Monaghan, 2003). For instance, it was observed in mice *Mus musculus* and rat *Rattus norvegicus*, (Bartke *et al.*, 2001 ; Rollo, 2002); in guppy, *Lebistes reticulatus*, (Comfort, 1963) or in wild lizard, *Niveoscincus microlepidotus*, (Olsson & Shine, 2002). Conversely, several studies on different strains of *Drosophila* showed no relationship between activity level and lifespan (Novoseltsev *et al.*, 2002 ; Promislow & Haselkorn, 2002 ; Voorhies *et al.*, 2003). In order to help clarifying this disagreement, we proposed to quantify aerobic metabolic capacities, as well as a set of key energy-demanding activities (*i.e.* growth and reproduction) in aging *Nothobranchius furzeri* acclimatized at two temperatures (*i.e.* 26°C and 22°C). *N. furzeri* is particularly interesting for studying the connections between bioenergetics and aging by being the shortest-lived vertebrate that can be reared in captivity with a lifespan, in wild-derived strains, of about 6 months (Terzibasi *et al.*, 2008). An individual approach was carried out to emphasize

the relationship between inter-individual variations in activities level and lifespan differences.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Fish

Nothobranchius furzeri of the strain MZM 0410 (Terzibasi *et al.*, 2008) were bred in LIENSs laboratory (Coast Environment & societies laboratory, La Rochelle, France), where complete life cycle of this species is controlled. From hatching to 10 days post hatching (dph), juveniles were kept in small tanks (L x l x h: 0.30 x 0.20 x 0.10 m) where (a) they were fed twice a day with newly hatched *nauplii* of *Artemia salina*, (b) about half of water was daily renewed and (c) conductivity was progressively increased from ~200 $\mu\text{S/m}$ to ~1300 $\mu\text{S/m}$. At 10 dph, fish were grouped in batch of 30 individuals and transferred in rearing tanks (L x l x h: 0.50 x 0.30 x 0.25 m). Fish were held in pure deionized water with artificial sea salt (1300 $\mu\text{S/m}$), fed twice a day *ad libidum* with *Chironomus larvae* and exposed to artificial light period of 12 hours per day. In these rearing tank, fish were acclimatized at 2 different temperatures: 25.6 ± 0.5 °C, considered as the optimal temperature for this species (Genade *et al.*, 2005), and 22.1 ± 0.8 °C, which is the lowest temperature allowing reasonable growth and reproduction (Durollet personal observations). In order to realize the individual monitoring of the various targeted activities, some of the rearing tanks were divided in two tanks with a mobile partition in order to further receive couple of *N. furzeri*. Each rearing tank and half rearing tank contained a nest filed with sand, where females could lay eggs.

4.2.2 Experimental protocol

4.2.2.a Growth and reproduction in groups

Table IV. 1 Chronology of the experiment for all the measured variables depending of the fish-ages: growth and reproduction in groups; AS, MMR and SMR in individuals, growth in individual. Reproduction was assessed through a set of variables: n_w for eggs production, \emptyset for eggs diameter, F for percentage of fertilized eggs in individuals, MI for percentage of mating interactions in couples. ★ represent target ages where measurement of the corresponding variable was realized. ■ symbolized the target periods during which the corresponding variable was monitored.

	juveniles								adults										senescents													
age (in weeks)	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
growth of groups	★		★					★						★						★						★						★
reproduction of groups		■	■				■	■					■	■					■	■					■	■						■
AS, MMR & SMR in individual																★																★
growth in individual			★					★						★						★						★						★
n ₀ produced per female																										■	■	■	■	■	■	
Ø of eggs produced per female																										■	■	■	■	■	■	
F% per male																																
MI % per couple																★																★

For each temperature, three groups of fish were used to follow reproduction effort and growth all along *N. furzeri* life cycle (26°C: $N_{\text{total}} = 102$; 22°C: $N_{\text{total}} = 85$, sex-ratio $\approx 1:1$). Monitoring were realized during different periods throughout the life cycle: 5 and 7 weeks-old representing the juvenile stage; 12, 18 and 24 weeks-old for the adult stage; 30, 36 and 42 weeks-old for the senescent stage (Table IV. 1).

4.2.2.b Growth

To assess growth, each fish of the three groups (per temperature) was sampled at each target-age (Table IV. 1). Fish were starved and anesthetized with MS-222 (Tricaine mesylate; 1.5 g l⁻¹) and to be individually weighed. Sustainable growth rate (SGR) was expressed in % week⁻¹ and calculated according to the following formula:

$$SGR_{w2-w1} = 100 \cdot (\ln \omega_{w2} - \ln \omega_{w1}) \cdot time^{-1} \quad \text{equation (1)}$$

where ω_{w1} and ω_{w2} are the initial and final mean body weights (g), respectively, over the period of time expressed in weeks.

4.2.2.c Reproduction

Reproduction effort was assessed through the production of eggs. This production was followed one week before and after each target-age (Table IV. 1). During the two considered weeks, nests of each rearing tank containing groups of fish were collected twice a week. Eggs were separated from the sand with a sieve, sorted out, and counted under a binocular microscope. Then, the number of eggs laid per female per day (*i.e.* n_w in the text) was assessed.

4.2.2.d Individual longevity, metabolism, growth, and reproduction effort

A total of 30 fish couples (22 °C: $N_{\text{couple}} = 16$; 26 °C: $N_{\text{couple}} = 14$; sex ratio = 1:1) were isolated from 7 weeks-old, (*i.e.* when it is possible to identify males and females) in each of the half rearing tanks.

4.2.2.e Longevity

Dead fish were daily scored and removed from their tank. Their longevities were expressed in weeks.

4.2.2.f Metabolism

Aerobic metabolic capacities of each individual (AS) were assessed at two different ages, 20 and 36 weeks to represent the adult and the senescent stage, respectively (Table IV. 1).

a. Experimental system

For this experiment, 8 intermittent flow respirometers were used in parallel. They were placed in 2 buffer tanks of 20 L, which contained each: 1) 4 identical size-adapted respirometers (diameter: 7.50 cm , volume: 0.18 l) and 2) one flush pump, which allowed water supply from the buffer tank to each of the 4 respirometers. The set-up was completed by a multichannel peristaltic pump, whose each channel was connected to a respirometer in order to insure water mixing inside. In each respirometer, fiber optic sensors measured the partial pressure of dissolved oxygen. Each sensor was connected to a four-channel oxygen meter, and two oxygen meters were used. This system allowed testing concomitantly 8 fish during each experimental trial.

b. Protocol

For maximum metabolic rate (*i.e.* MMR) assessment, each experimental fish was transferred from the rearing tanks to a small volume tank (L x l x h: 0.2 x 0.10 x 0.05 m), where they were individually chased with a stick until exhaustion to increase their metabolism (*e.g.* Schurmann & Steffensen, 1997; Lefrançois & Claireaux, 2003; Jourdan-Pineau *et al.*, 2010; Cannas *et al.*, 2013, Clark *et al.*, 2013). Fish were considered being exhausted when they stopped to escape (*i.e.* after about 3 min). Each fish was then placed into a respirometer, and its oxygen consumption was immediately measured during 20 min. After this first oxygen consumption measurement, each individual was again chased while into the respirometer; oxygen consumption was thereafter measured for 20 min.

For standard metabolic rate (*i.e.* SMR) assessment, fish were kept inside the respirometers during the following 36 h at rest, without external disturbance nor food. During this period, an alternation between phases of oxygen renewal and oxygen consumption (MO_2) measurements was respected with a cycle of 15:15 min. At the end of each experimental trial, fish were removed from the respirometers and anesthetized with MS-222 (Tricaine mesylate; 1.5 g l^{-1}) to measure their body mass. To subtract the microbial oxygen consumption from the total oxygen consumption inside respirometers, a 30 min blank measurement was performed before and after each experimental trial. The expected value of microbial oxygen consumption, assumed to be linear throughout the experiment (Steffensen, 1989 ; Lucas *et al.*, 2014b), was subtracted from the corresponding total oxygen consumption measured.

c. Data analysis

Oxygen consumption (MO_2) is expressed in $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and calculated according to the following formula:

$$MO_{2\text{meas}} = \frac{\Delta [O_2] \cdot V}{\Delta t \cdot M_{\text{meas}}} \quad \text{equation (2)}$$

where $\Delta [O_2]$ (in $\text{mgO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$) is the variation in oxygen concentration during the measurement period Δt (in h) and V (in l) is the volume of the respirometer minus the volume of the fish, M_{meas} (in g) is the fish mass measured.

In order to correct $MO_{2\text{meas}}$ from the size effect, an allometric relationship between oxygen consumption and body mass was used:

$$MO_{2\text{cor}} = MO_{2\text{meas}} \cdot (M_{\text{meas}} \cdot M_{\text{cor}}^{-1})^{1-b} \quad \text{equation (3)}$$

where MO_{2cor} (in $mgO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$) is the oxygen consumption related to a standard 1g-fish (M_{cor}), MO_{2meas} (in $mgO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$) is the oxygen consumption calculated for experimented fish whose mass was $M_{(meas)}$ (in g), and b is the allometric scaling exponent describing the relation between oxygen consumption and body mass of fish. In this study, we used $b_{MMR}=0.926$ for MMR estimation and $b_{SMR}=0.965$ for SMR estimation, as describing in Lucas *et al.* (Lucas *et al.*, 2014a) for *Danio rerio*, a similar-size species.

MMR was assessed as the maximal MO_2 measured after the fish being chased (*c.f.* Chapter 2. 3.1.). SMR was calculated from a frequency histogram of the MO_2 data collected during the last 24 hours of experimental trial (*c.f.* Chapter 2. 3.2.). This produces a bimodal distribution due to the routine activity of the fish. Two normal curves were fit to the MO_2 frequency histogram to separate the SMR peak from the peak of more elevated metabolism related to routine activity (Steffensen *et al.* 1994, Durollet *et al.* 2015, *submitted*). Aerobic metabolic scope (AS) of each individual was assessed through the difference between its MMR and SMR.

4.2.2.g Growth

As for the fish held in group, the monitoring of individual growth was realized during different periods throughout the life cycle: 7 weeks-old representing the juvenile stage; 12, 18 and 24 weeks-old for the adult stage; 30, 36 and 42 weeks-old for the senescent stage, and the same protocol was applied in order to obtain, for each target-age, the SGR of each individual (Table IV. 1).

4.2.2.h Reproduction effort

To study the reproduction effort of each couple, two periods were selected: 1) from 14 to 20 weeks, *i.e.* surrounding the age at which AS was maximum in *N. furzeri* acclimatized at the optimal temperature (*i.e.* 17 weeks-old at 26 °C; Duroillet *et al.*, 2015, *submitted*); and 2) from 30 to 34 weeks, representing the senescent stage (Table IV. 1). Reproduction effort was individually characterized through a panel of variables. Regarding the females, the eggs number laid (n_w ; *c.f.* Chapter 2. 1.) and the eggs diameter (\emptyset) were assessed, while in the males, the target variable was the percentage of fertilized eggs (F). In addition, for each couple, the time allocated to mating interactions was assessed (MI).

a. Eggs number, diameter, & percentage of fertilised eggs

For each studied period, eggs were collected following the same protocol described for the reproduction monitoring in groups (*c.f.* Chapter 2. 1.). As for fish held in groups, it allowed, for each female, to assess its daily production of eggs (n_w). In addition, the diameter of all the eggs collected was measured (total eggs number: 22 °C: N = 10190 and 2698, in 14 to 20 weeks-old individuals and in 30 to 34 week-olds individuals, respectively; 26 °C: N = 8967 and 891, in 14 to 20 weeks-old individuals and in 30 to 34 weeks individuals, respectively). This was carried out under a binocular microscope, using the Leica Application Suite interactive measurement software (Leica Microsystems GmbH). The diameter of all the eggs a female produced was averaged, in order to assess a mean size egg for each female (*i.e.* \emptyset in mm). Then, for each studied period (Table IV. 1), the totality of eggs produced by each female was sorted out according to two categories, non-fertilized and fertilized eggs. It allowed obtaining, for each male of each couple, the percentage of fertilized eggs during each studied period (*i.e.* F in the text).

b. Mating interactions

Nothobranchius furzeri females, which are oviparous, have several spawning bouts during the days. Laid eggs are immediately fertilized by males, which are constantly ready to mate, and spend a lot of time seeking females to initiate spawning (Polačik *et al.*, 2011 ; Cellerino *et al.*, 2015). Indeed, mating interactions allocated to reproduction could represent a major energy expenditure in this species. It was therefore decided to assess the variable “mating interactions” between male and female of each experimental couple, at two different tested ages, 20 weeks-old (*i.e.* adult stage) and 36 weeks-old (*i.e.* senescent stage; Table IV. 1). To achieve this, each couple was filmed during 28 h. Male and female were considered to interact together when they were at least closer than 1 cm. The variable considered (MI in the text) was calculated on an hourly base and represents the average percentage of time during which male and female interacted together.

For MI assessment, each couple was transferred from the rearing tanks to specific experimental aquaria around 8 am. During the experiment, fish were fed twice a day with chironomus larvae (*i.e.* at ~ 9 am and ~ 4 pm) and were kept under water quality, temperature and artificial light period similar to the characteristics while into the rearing tank. A particular attention was also taken to minimize disturbance, in order to do not influence the fish behaviour. The second day of the experiment, around 12 pm, couples were removed from their experimental aquarium, and replaced into their initial rearing tank.

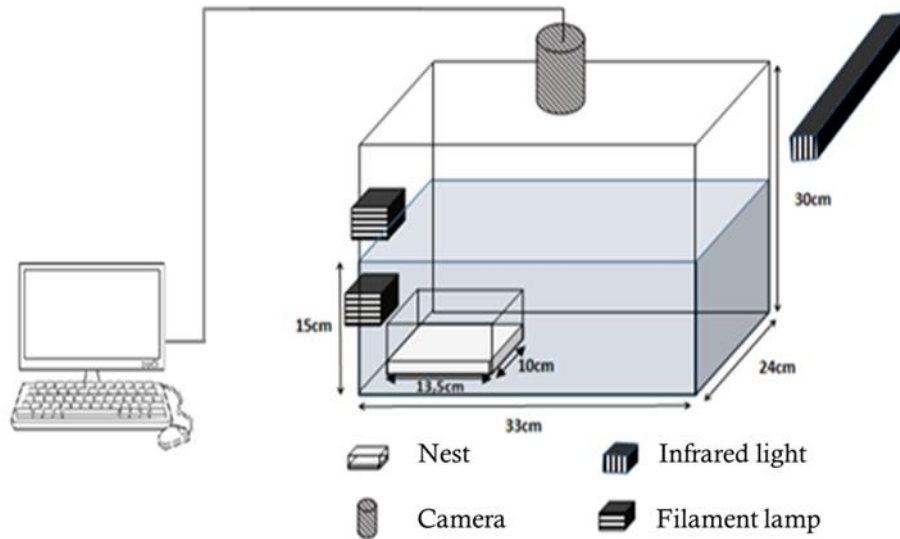


Figure IV. 1 Experimental set-up to film one couple, containing an aquarium with a nest full of sand, a monochrome camera connected to a computer, 2 infrared lights to shoot at night, and one filament lamp to shoot at day.

Four specific experimental aquaria (L x l x h: 0.33 x 0.24 x 0.30 m) were used in parallel in order to film 4 couples simultaneously. To follow fish all along the experiment, there was no shadow area, neither place where fish could hide in the aquaria. Thanks to 2 infrared lights per aquarium, fish were also filmed during the night. Each experimental aquarium was filmed by one matrix camera monochrome at a frequency of 10 images per second (IDS UI-3240CP-NIR-GL, with a 2 megapixel Ricoh FL-CC0614A-2M lens), connected to a computer (Figure IV. 1). During the 28 experimental hours, fish behavior was continuously recorded through successions of 5 min-videos in AVI format (*i.e.* 336 videos per couple were recorded).

Videos, during which feeding events or day/night shift episode occurred, were systematically excluded. Thus, only videos where couples were undisturbed were considered. Then, among these videos, two videos per h were randomly selected to alleviate the tracking work (*i.e.* 56 videos per couple were analysed). Each individual was

tracked using Idtracker software (Pérez-Escudero *et al.*, 2014). This software, allowed tracking 2 fish per video by identifying light contrast differences between each of the two animals. Idtracker estimates for each fish the coordinates (x;y) for all the images of movies.

4.2.3 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using Statistica software. The normality (using the Kolmogorov-Smirnoff test) and homoscedaticity (using the Barlett test) of data were found to be respected. Therefore, for each measured variable (AS, MMR, SMR, n_w , \emptyset , F and MI), two-way ANOVA was used to determine significant differences due to age and temperature ($p < 0.05$). In addition, to emphasize if the activity level, that an individual presents while adult, influences its activity level at the senescent stage, a Kendall rank correlation coefficient has been employed ($p < 0.05$). Furthermore, in order to highlight if metabolic capacities and/or activities levels impact the longevity of an individual, a Spearman's rank correlation coefficient has been used ($p < 0.05$).

4.3 Results

4.3.1 Growth and reproduction in groups

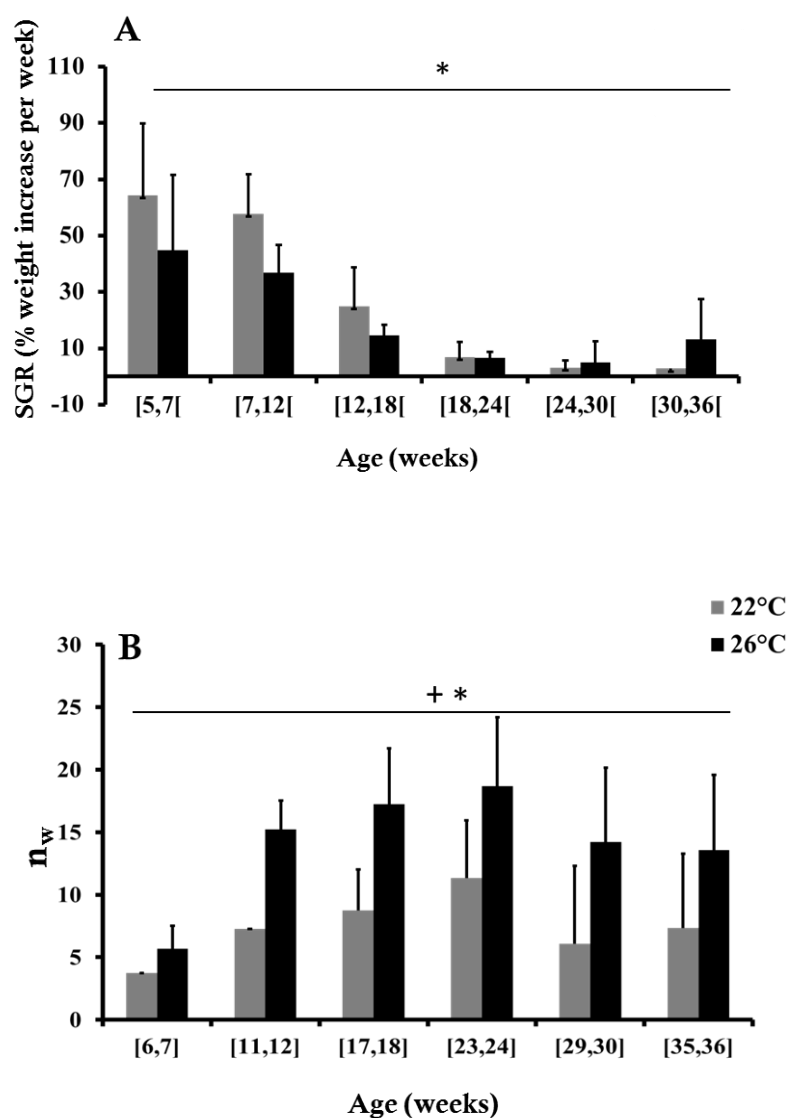


Figure IV. 2 (A) Specific Growth Rates (SGR; mean \pm SE), and (B) Eggs production.female⁻¹.day⁻¹ (n_w; mean \pm SE), depending on age in *Nothobranchius furzeri* acclimatized at two experimental temperatures, 22 and 26 °C. A total of 187 individuals were used to measure SGR (22 °C: N_{tot} = 85, 26 °C: N_{tot} = 102; sex-ratio \approx 1:1).n_w was followed on a total of 67 females (22 °C: N_{tot} = 41; 26 °C: N_{tot} = 56). * symbolizes a significant difference due to age, and + represents a significant impact of temperature. No combined effect was revealed.

Temperature did not significantly impact *Nothobranchius furzeri* sustainable growth rates, contrary to age, which showed a significant and similar influence at the two tested temperatures (Two-way ANOVA, temperature: $p\text{-value} = 0.615 \times 10^{-1}$, age: $p\text{-value} = 0.110 \times 10^{-8}$; combined effect: $p\text{-value} = 0.286$; Figure IV. 2A). The pattern observed on Figure IV. 2A suggests that the greatest growth rate was observed in 5 to 12 weeks-old individuals. Then, growth rate progressively decreased until individuals were 18-weeks-old, to further become almost nil for the last tested-ages. Regarding eggs production, it varied significantly with the temperature (Two-way ANOVA, $p\text{-value} = 0.185 \times 10^{-8}$; Figure IV. 2B); 26°C-acclimated females producing more eggs. In addition, two way ANOVA revealed a significant effect of age ($p\text{-value} = 0.139 \times 10^{-9}$), whatever the temperature of acclimatization (combined effect: $p\text{-value} = 0.106$). For both temperatures, eggs production indeed tended to strongly increases from 7 to 12 weeks. Then, eggs production was still increasing between 12 and 24 weeks, but at a slower rate. Finally, n_w slightly declined at further ages.

4.3.2 Growth in individual

Contrary to the observations made in groups of *N. furzeri*, individual sustainable growth rate was not significantly impacted by age, whatever the temperature of acclimatization (Two-way ANOVA; age effect: $p\text{-value} = 0.718 \times 10^{-1}$; age * temperature effect: $p\text{-value} = 0.670$). Temperature reduction led to a significant decrease of the SGR at both tested-ages (Two-way ANOVA; temperature effect: $p\text{-value} = 0.178 \times 10^{-2}$).

4.3.3 Metabolism in individual

AS and MMR were significantly impacted by age (Two-way ANOVA; $p\text{-value} = 0.469 \times 10^{-3}$, Figure IV. 3; for MMR, $p\text{-value} = 0.940 \times 10^{-3}$; Table IV. 2). They both indeed

tended to decrease with age, contrary to the SMR, which was not significantly impacted by senescence (Two-way ANOVA, p -value = 0.415; Table IV. 2). Regarding temperature, no significant effect on AS, MMR and SMR was detected (for AS Two-way ANOVA, p -value = 0.973, Figure IV. 3; for MMR, p -value = 0.468; for SMR, p -value = 0.152×10^{-1} ; Table IV. 2). No combined effect between temperature and age on SMR was observed (Two-way ANOVA, p -value = 0.666; Table IV. 2).

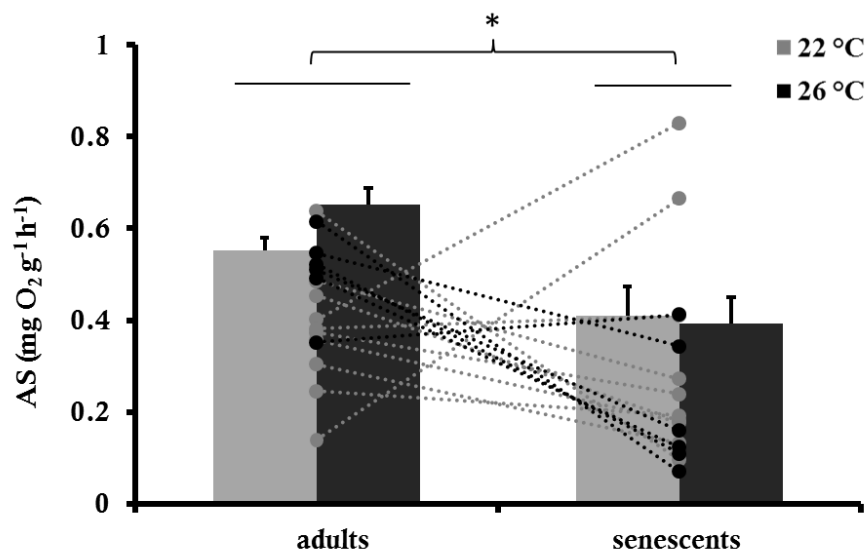


Figure IV. 3 Aerobic Scope (AS) of *Nothobranchius furzeri* as a function of age, at the two experimental temperatures. For each target age and temperature, there were as many females as males that were tested, with at 26 °C: $N_{\text{tot}} = 24$ and 8 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively; and at 22 °C: $N_{\text{tot}} = 26$ and 8 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively. Mean (\pm SE) assessed on all the tested fish are represented by histogram bars, and each individual that was tested at both experimented-age are represented by two dots (*i.e.* one for each tested-ages) connected by a dotted line. * symbolizes a significant difference due to age, showed by a two-way ANOVA (p -value < 0.05). No temperature neither combined effect was found.

Table IV. 2 Maximum Metabolic Rate (MMR, mean \pm SE), and Standard Metabolic Rate (SMR, mean \pm SE) of *Nothobranchius furzeri* as a function of age, at the two experimental temperatures. For each target age and temperature, there were as many females as males that were tested, with at 26 °C: N_{tot} = 24 and 8 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively; and at 22 °C: N_{tot} = 26 and 8 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively.

		22 °C		26 °C		Two-way ANOVA p-value		
		20 weeks	36 weeks	20 weeks	36 weeks	age	temperature	age*temperature
MMR mg O ₂ g ⁻¹ h ⁻¹	mean	0.551	0.410	0.653	0.393	0.940 x 10 ⁻³	0.468	0.311
	SE	\pm 0.029	\pm 0.075	\pm 0.040	\pm 0.125			
SMR mg O ₂ g ⁻¹ h ⁻¹	mean	0.164	0.135	0.199	0.190	0.415	0.512 x 10 ⁻¹	0.666
	SE	\pm 0.011	\pm 0.023	\pm 0.015	\pm 0.070			

4.3.4 Reproduction in individual

4.3.4.a Female's reproduction

The number of eggs produced per female per day was significantly impacted by age (Two-way ANOVA, age: p-value = 0.469 x 10⁻²; Figure IV. 4A). Adult females produced about 3 times more eggs compared to the senescent ones. Although the quantity of eggs produced in senescent females was slightly higher in 22 than in 26°C-acclimated individuals, no significant impact of the temperature and no combined effect was observed (Two-way ANOVA temperature: p-value = 0.434, age*temperature: p-value = 0.367; Figure IV. 4A). Individual variation in eggs production with age did not highlight any general pattern (Kendall rank correlation coefficient; p-value = 0.250); some females showed a great reduction of eggs produced between the adult and the senescent stage, while others presented a rather stable n_w from adult to senescent stage (Figure IV. 4A).

In parallel, there was no significant impact of age nor temperature on eggs diameters (\emptyset), while a combined effect was observed (Two-way ANOVA; age: p-value = 0.747; temperature: p-value = 0.553 x 10⁻¹; age*temperature: p-value = 0.333 x 10⁻¹; Figure IV.

4B). From the adult to the senescent tested-ages, the diameter of the eggs laid by the 22 °C-acclimated females mainly decreased, contrary to what observed in the 26 °C-acclimated individuals.

In addition, exploring the individual pattern from the adult to the senescent stage, the influence of age was found to depend on the acclimation temperature of the female (Kendall rank correlation coefficient; $p\text{-value} = 0.451 \times 10^{-1}$).

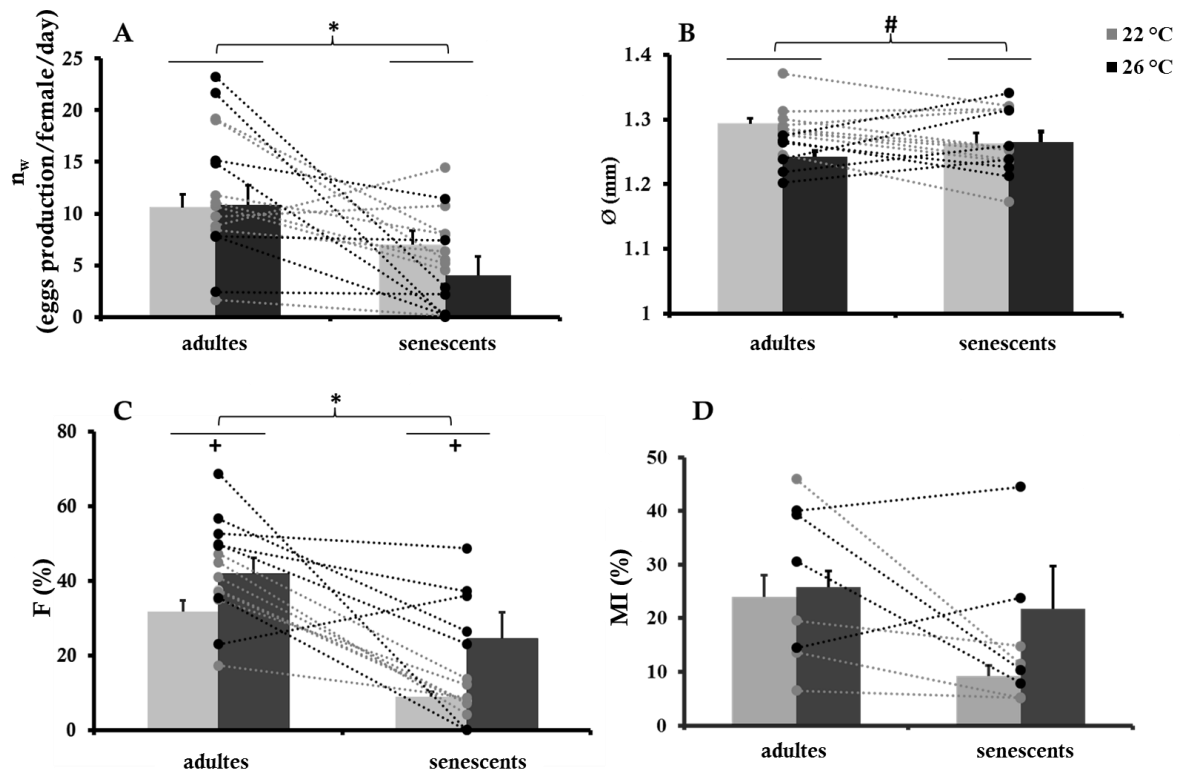


Figure IV. 4 (A) Eggs production.female⁻¹.day⁻¹ (n_w), (B) Eggs diameter in mm (\emptyset), (C) Percentage of fertilized eggs.male⁻¹ (F ; 22 °C: $N_{\text{couples}} = N_{\text{females}} = N_{\text{males}} = 16$ and 7, in 14 to 20 weeks-old individuals and in 30 to 34 weeks-olds individuals, respectively; 26 °C: $N_{\text{couples}} = N_{\text{females}} = N_{\text{males}} = 14$ and 9, in 14 to 20 weeks-old individuals and in 30 to 34 weeks-old individuals, respectively), and (D) Percentage of mating interactions between male and female of a couple (MI; mean \pm SE); during 28 experimental hours, depending on age in couples of *Nothobranchius furzeri* acclimatized at two experimental temperatures (22 °C: $N_{\text{couple}} = 13$ and 4 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively; 26 °C: $N_{\text{couple}} = 14$ and 4 for 20 and 36 weeks-old individuals, respectively). Mean (\pm SE) assessed on all the tested fish are represented by histogram bars, and each individual that were tested at both experimented-age are represented by two dots (*i.e.* one for each tested-ages) connected by a dotted line. * symbolizes a significant difference due to age, + represents a significant impact of temperature, and # illustrate a significant combined effect of age and temperature different, showed by a two-way ANOVA ($p\text{-value} < 0.05$).

4.3.4.b Male's reproduction

The percentage of eggs fertilized by males was significantly impacted by both age and temperature (Two-way ANOVA; age: $p\text{-value} = 0.136 \times 10^{-3}$; temperature: $p\text{-value} = 0.119 \times 10^{-2}$; Figure IV. 4C). A greater ratio of eggs was fertilized by the adult males. Moreover, the 26 °C-acclimated males were more efficient in eggs fertilization compared to the 22 °C-acclimated individuals. Even if the difference induced by age seemed to be more pronounced for the 22 °C-acclimatized fish, no combined effect was revealed (Figure IV. 4C: Two-way ANOVA; age*temperature: $p\text{-value} = 0.273$). A closer look based on the individual variation in F revealed that, excepted for one fish, all males showed a decreasing percentage of fertilized eggs with age. However, no rank correlation was highlighted regarding the capacity of fertilization of males from the adult to the senescent stage; males which may be considered as top performers while adult weren't among the best, neither the worst, at the senescent stage (Kendall rank correlation coefficient; $p\text{-value} = 0.741$).

4.3.4.c Mating interactions

Regarding the mating interactions in couples, males tended to diminish females seeking when they were senescent, and particularly while acclimated at 22°C (about 3 times less). However, it has not been demonstrated any significant effect of age nor temperature, neither a combined effect (Two-way ANOVA; age: $p\text{-value} = 0.697 \times 10^{-1}$; temperature: $p\text{-value} = 0.165$; age*temperature: $p\text{-value} = 0.296$; Figure IV. 4D). About individual variation from the adult to the senescent stages, different patterns were noticed whether couple allocated a lot of time for MI at the adult stage, or not. Most of the couples that devoted important time to MI at their adult stage, had a smaller MI when older.

However, two couples, which were acclimatized at 26 °C, showed an increase of MI with age. No rank-correlation was observed between MI of each couple at 20 weeks-old and 36 weeks-old (Kendall rank correlation coefficient; p-value = 0.347).

4.3.5 Correlations between activity levels, metabolic response & lifespan in individual

Table IV. 3 Correlations between the measured variables (*i.e.* AS for aerobic scope, MMR for maximum metabolic rate, SMR for standard metabolic rate, SGR for sustainable growth rate, n_w for eggs production, \emptyset for eggs diameter, F for percentage of fertilized eggs, and MI for percentage of mating interactions in couples) in adults *Nothobranchius furzeri* and their respective longevity.

	Correlations	
	R ²	p-value
AS (20 weeks) & Longevity	-0.500 x 10 ⁻³	0.928
MMR (20 weeks) & Longevity	0.243	0.876
SMR (20 weeks) & Longevity	0.376	0.183
SGR ([12;18[weeks) & Longevity	0.400 x 10 ⁻³	0.646
n_w ([14,18[weeks) & Longevity	0.384 x 10 ⁻¹	0.188
\emptyset ([14,18[weeks) & Longevity	0.104 x 10 ⁻¹	0.263
F ([14,18[weeks) & Longevity	0.425 x 10 ⁻¹	0.305
MI (20 weeks) & Longevity	0.611 x 10 ⁻¹	0.061

The reduced temperature induced a significant increase of the age-dependent survival rates in *Nothobranchius furzeri*. *N. furzeri* lived between 18 and 59 weeks-old at 26 °C and between 13 and 67 at 22 °C. The median survival of these fish was 34.6 and 42.1 weeks-old for 26 and 22 °C-acclimated fish, respectively. The hypothesis was that reduced longevity would be associated with high activity level. However, in the present study, we

demonstrated that longevity was not correlated with any of the measured variables in adult-individuals (*i.e.* AS, MMR, SMR, Growth, n_w , \emptyset , F and MI, Table IV. 3).

4.4 Discussion

The aim of our study was to emphasize to which extent the age-dependant variations in aerobic metabolic scope (AS) may impact activity level in individuals with different body temperature; and if it is liable to count for differences in longevity. Globally, we observed that AS variation in aging individuals was associated with differences in both eggs production and size in females, as well as in the efficiency of eggs fertilization by males; while no significant modification in mating interactions was noticed. Temperature reduction did not impact metabolic capacities in senescent fish, but had an effect with a non-clear general pattern, *i.e.* different according to the monitored variable. Then, although individual differences in some activities level in adults appeared to influence their activity level when they became older, AS nor activity levels were not found to be correlated with lifespan.

Durollet *et al.* (2015, *submitted*) highlighted that temperature reduction delayed and slowed-down the AS decline observed in aging *Nothobranchius furzeri* (*c.f.* **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). To explore the potential associated variations in growth and reproduction, we performed a monitoring in groups of aging *N. furzeri*. Contrary to what has been observed in other species (Pechenik, 1984 ; Angilletta *et al.*, 2004), a reduction in sustainable growth rate (SGR) was not associated to the temperature-dependant reduction in AS (Figure IV. 2A). However, growth measurements began in 5 weeks-old fish, and their average mass was already 2.6 higher in 26 °C-acclimated individuals compared to the individuals exposed to 22 °C. It may be therefore possible that it is from

hatching to 5 weeks-old that growth rate was particularly elevated and sensitive to environmental modifications, such as temperature reduction. Hemmer-Brepson *et al.* (2014) neither observed temperature effect on SGR in aging medaka *Orizias latipes*, another species with a quite short lifespan. These authors reached the conclusion that the rapid phase of growth occurred very early in the juvenile stage, and that the growth measurements they carried out were too late and did not allow highlighting it. Similarly, the phase of rapid growth of 5 weeks-old *N. furzeri* may be already well advanced, as suggested by various authors (Polačik *et al.*, 2011 ; Blažek *et al.*, 2013). It is also worth noticing (i) that the decreasing SGR with age was concomitantly accompanied by an increase in eggs production and (ii) that SGR was close to zero when fish reached the maximum eggs production (Figure IV. 2A & B). This may be the result of a progressive shift in energy allocation from somatic to gonadal growth, illustrating the trade-off between these two activities as observed in many other teleost species (Casselman, 1987 ; Kozłowski, 1992 ; Roff, 2001 ; van der Veer *et al.*, 2009 ; Kooijman & Lika, 2014).

In aging *Nothobranchius furzeri*, eggs production per female per day (n_w , Figure IV. 2B) was reduced in female acclimated at 22 °C, which may illustrate a lower energy allocation to gonads development. In general, eggs production in aging *N. furzeri* tends to follow a bell-shaped curve, with a maximum between 24 and 30 weeks at both experimental temperatures. At the lowest temperature tested, this pattern is in accordance with the AS pattern of bell-shape curve observed in aging *Nothobranchius furzeri*. Indeed, Durollet *et al.* (2015, *submitted*) highlighted that the 22 °C-acclimated fish reached their metabolic optimal age at 25.2 weeks-old. At 26°C, the age for maximum eggs production is however almost 10 weeks-delayed compared with the optimal age related to metabolic capacity (Durollet *et al.*, 2015, *submitted*). This shift may arise from a variety of causes. One reason might be that eggs production is not the only parameter

that may illustrate an optimal reproduction in females. Others variables characterize females reproduction effort, such as the eggs size, the lipids and proteins ovaries composition, the ratios of gonad to somatic mass (Watanabe *et al.*, 1984 ; Pavlov & Moksness, 1994 ; Brooks *et al.*, 1997).

Because it does necessitate the animal's sacrifice, eggs size monitoring was conducted and associated to the assessment of eggs production, it allowed distinguishing two main patterns in 22 and 26°C- acclimated individuals. At 26°C, the females produced a decreasing quantity of eggs from the adult to the senescent stage, while a slight increasing size of eggs was observed (Figure IV. 4B). Our results suggest that a trade-off may exist between the number of eggs laid and their size in *N. furzeri*, as it was observed in brown trout *Salmo trutta* (Lobon-Cervia *et al.*, 1997). It is probable that decreasing available energy, in aging individuals, triggers shift in the reproductive strategy. In order to compensate the decrease in offspring, eggs size may be increased to foster their survival, as it was suggested by Fleming & Gross (1990) in the pacific salmon *Oncorhynchus kisutch*. It is worth noticing that the absence of aging effect on mating interactions (Figure IV. 4D) suggests that senescent and adult females were equally sought by the males in order to provoke spawning. Decreasing n_w with age is therefore not induced by a lower stimulation by males. Females decline in eggs production could be mainly due to a progressive gonadic senescence, as it was observed in other teleost species (Craig, 1985 ; Kishi *et al.*, 2003 ; Kishi, 2004), rather than to a change in reproductive behaviour.

On the contrary, at 22°C, there was no difference in eggs size and a less important decline in eggs production with age. In addition, temperature reduction did not change MI. It suggests that in 30 to 34 weeks-old *N. furzeri*, senescent-related impairments are not

evident yet. It is likely that the 4°C-decrease experienced by the fish delayed gonadic senescence.

The individual monitoring also allowed characterizing males reproduction effort, through their efficiency to fertilize the eggs. Temperature reduction did not regulate the age-related decline in the efficiency of males to fertilize the eggs. Senescent males were less efficient to fertilize eggs compared to the adult males, whatever the temperature (Figure IV. 4C). Males success to fertilize eggs is influenced by several parameters, as seminal plasma composition (Aas *et al.*, 1991 ; Ciereszko *et al.*, 1996), and sperm quality depending on both the number of spermatozoid and spermatozoid swimming speed (Ball & Parker, 1996 ; Stockley *et al.*, 1997 ; Casselman *et al.*, 2006). Among these parameters, sperm quality may be involved in F reduction with temperature and age, and may be induced by the progressive decreasing in testosterone production. It has been demonstrated in other vertebrates that testosterone production declines with age (Gray, 1978 ; Chambers & Phoenix, 1984 ; Chambers *et al.*, 1991 ; Flood *et al.*, 1995 ; Tomm *et al.*, 2015). Donelson *et al.* (2010) also observed a temperature-dependant reduction in F in damselfish *Acanthochromis polyacanthus*; they blamed the lower sperm quality induced by a decline in testosterone production. Level of sex hormones is also known to influence fish mating behavior (Liley, 1969 ; Smith, 1969 ; Stacey & Kyle, 1983). However, contrary to what one expected, *Nothobranchius furzeri* mating interactions were not impacted by temperature nor age (Figure IV. 4D). It would therefore be appropriate to carry out hormones dosage in aging *N. furzeri*.

To explore to which extent individual variation in energy potential may account in growth and reproduction effort, the aerobic metabolic scope was assessed. First, it is worth noticing that, contrary to what Durollet *et al.* (2015, *submitted*) observed,

temperature did not have a regulator effect on AS and MMR pattern in aging, since both decreased between the adult and the senescent stages at 22 and 26°C to the same extent (Figure IV. 3). The main explanation could be that metabolic capacity were in fact measured only at two ages (*i.e.* 20 weeks-old as the adult stage, and 36 weeks-old as the senescent stage), while Durollet *et al.* (2015, *submitted*; and Chapter 3) quantified AS at 8 different ages all along the *N. furzeri* life cycle (*i.e.* from 5 to 42 weeks-old). Nevertheless, our present results globally matched the pattern of AS measured in *N. furzeri* by Durollet *et al.* (2015, *submitted*, and Chapter 3). This was particularly the case in adult acclimated at 26 °C, while at 22 °C, AS of adult fish was slightly highest in the present study, but still in the same range in amplitude. Then, both AS and maximum metabolic rate (MMR) significantly decreased with advancing age (Figure IV. 3, Table IV. 2), as in Durollet *et al.* (2015, *submitted*, Chapter 3) observed in the same species. As suggested by previous authors (Sekhon & Beams, 1969 ; Phillips *et al.*, 2000), the concomitant AS and MMR reduction is likely to be at least partially due to the loss of mitochondria, as well as their progressive impairment in functionality with aging, which induces a decrease in the capacity to aerobically produce ATP. AS decline in aging was associated with decrease in females eggs production, as well as with males reduced efficiency to fertilized eggs; while no modification in mating interactions was noticed. While concerning the temperature reduction, no general pattern emerged. Then, inter-specific differences in some activities level at the adult stage seemed to influence specific level at the senescent stage.

Whatever the temperature of acclimatization, SMR did not vary in aging *Nothobranchius furzeri* (Table IV. 2). It may suggest that rate of metabolic process to sustain vital functions do not vary in aging. This contradicts others studies which showed an age-dependant increase of SMR, imputed to the increase of energetics demand to fight against age-related diseases (McCarter and Palmer, 1992; Rønning *et al.*, 2014). In

addition, organism's defenses against oxidative stress induce an elevation in energetic demand of the immune system along the senescence (Henken & Brandsma, 1982 ; Rozenzweig *et al.*, 1987 ; Apanius, 1998 ; Martin *et al.*, 2003), which usually involves the SMR increase in the organism. Moreover, an increase of oxidative stress liver and muscle in aging *Nothobranchius furzeri* was observed (Milinkovitch *et al.*, 2015, *submitted*, annexe 1). The fact that SMR remains stable in aging *Nothobranchius furzeri* is therefore confusing.

It is also relevant to notice that SMR assessment in the adult and senescent *N. furzeri* may partly include some energetic costs related to reproduction, given that this species reproduced daily. Through our measured variables (*i.e.* n_w , \emptyset , F), we observed that reproduction effort decline with age. Therefore, this activity may be less energy-demanding in the senescent individuals. To compensate the increase in energy allocated to fight against age-related diseases, and keep a stable SMR in aging, *Nothobranchius furzeri* may present a trade-off between immune system and reproduction, as it was observed in aging medaka *Oryzias latipes* (Hemmer-Brepson *et al.*, 2014). This may contribute to compensate the increase in energy allocated to fight against age-related diseases, and keep a stable SMR.

Both individual differences in activity level diversity of longevity were observed. This is in accordance with Durollet *et al.* (2015, *submitted*, Chapter 3): Among the 187 *N. furzeri* they tested, fish lived between 7.5 and 57.5 weeks-old at 26 °C and between 8 and 65.5 at 22 °C. We hypothesized that individual differences in longevity may be due to specific differences in AS and strategy in energy allocation in aging individuals. Indeed, according to the “rate of living” theory, animals living at a faster activity rate are expected to have a shorter lifespan in comparison with those who would sustain less energy demanding activities (Sohal, 1986 ; Biesmeijer & Tóth, 1998 ; Sgrò & Partridge,

1999 ; Metcalfe & Monaghan, 2003). Moreover, individuals showing higher energy-demanding activities produce more ROS. This leads to a faster decline of the organisms in aging through potential deterioration of the immune system. Therefore, we supposed that adults “top-performers” in their activities will experience more important age-dependant decline in AS and activities, in comparison to individuals that would be less performant at the adult stage. One of the difficulties in the exploration of such a pattern was that the target variables in the present study did not highlight a general pattern with aging. It seems that a majority of adult females that produced a large amount of eggs were part of the less productive individuals at the senescent stage (Figure IV. 4A). Because of the trade-off between eggs number and size, an opposite pattern was observed in eggs size variation with age: most of the fish that produced small eggs at the adult stage, laid larger eggs when fish became older. However, such a pattern was not observed regarding males efficiency to fertilized eggs, or mating interactions. The relationship between activity levels/metabolism and longevity was particularly hard to establish because of the panels of individual variation in activity level. Another difficulty was due to natural mortality, the number of monitored-fish from the adult to the senescent stage being indeed restricted. It's therefore difficult to conclude on a general strategy regarding the individual variation in activity investment while aging.

Along the same line of thought, inter-individual differences in both adults AS and activity levels were expected to participate to individual dissimilarities in longevity. However, longevity of individuals was not correlated to their aerobic metabolism, considering global metabolic capacities of the animal or specific levels of metabolism, such as SMR or MMR (Table IV. 2). Then, we supposed that high activity level in 26 °C acclimated-fish will be associated with reduced longevity. Nevertheless, among all measured variables in adult stage (*i.e.* growth; n_w , \emptyset , F and MI) representing the reproduction

effort; none were correlated with longevity (Table IV. 3). Our results disagrees with the “free-radical theory” which postulates that faster rate of metabolism, associated with a greater ROS generation, would hasten aging (Harman, 1992 ; Finkel & Holbrook, 2000).

As a conclusion, we have not emphasized that the aging-dependant, neither the regulatory role of temperature changes in AS observed by Durollet *et al.* (2015, *submitted*, Chapter 3) was associated with clear modulation of growth and reproduction. In addition, none of the variables considered seemed to play a key role in lifespan, even if they possibly could participate to individual differences in longevity.

One limitation of our study is that replicates number was low, especially in older-individuals. Because of natural mortality, it was obviously not possible to test as much adults as senescent. This replicates imbalance possibly rendered statistical test less efficient. Moreover, if the variables that we measured are related to key functions for an organism, they however do not provide an overall vision of the activity level of an individual. Thus, it is difficult to conclude on the relationship between activity/metabolism level and lifespan.

Also, this extremely short lifespan species, which only survives to the dry season through eggs diapause, may have an energetic strategy that will be favorable to reproduction regarding others activities. It may result that reproduction is not the most impacted function with advancing age. Therefore, it may be interesting to explore strategy in energy allocation induced by the age-dependant decline in AS. That may be realized by focusing on activities that are considered to be the most costly in energy (*i.e.* digestion and intense locomotion; (Brett, 1964 ; Beamish, 1978 ; Jones & Randall, 1979 ; Tandler

& Beamish, 1979 ; Jobling, 1981 ; Soofiani & Hawkins, 1982 ; McCue, 2006 ; Jordan & Steffensen, 2007).

Chapitre 4 - Partie 2 :

Digestion et locomotion au cours du

vieillissement chez *Nothobranchius furzeri* : effet

régulateur de la température

Digestion & locomotion au cours du vieillissement chez *Nothobranchius furzeri* : effet régulateur de la température

Marie Durollet^{1*}, Morten Bo S. Svendsen², Julie Lucas¹, Isabelle Percelay¹, Thibaut Charmoille¹, Adrien Inacio¹, Léa Kayser¹, Emmanuel Dubillot¹, Christel Lefrançois¹

¹Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS - Université de La Rochelle, La Rochelle, France

²Marine Biological Laboratory, University of Copenhagen, Helsingør, Denmark

*Author for correspondence (marie.durollet@univ-lr.fr)

Keywords: Metabolic capacities, SDA, locomotion, aging, lifespan,

Nothobranchius furzeri

4.5 Introduction

Les performances écologiques d'un organisme (e.g. croissance, reproduction, locomotion) dépendent de sa capacité à produire et partitionner l'énergie entre ces processus biologiques. Cette énergie à travers la production d'ATP, découle principalement du métabolisme aérobie nécessitant de l'oxygène comme accepteur d'électrons (consommation d'O₂). En absence d'O₂, une voie alternative le métabolisme anaérobie, permet de maintenir une production d'ATP toutefois 19 fois moins efficace que le métabolisme aérobie. La capacité à produire et utiliser l'énergie par les organismes est donc principalement associée à la voie aérobie et donc à leur capacité à transporter l'O₂ dans leur tissu (Pörtner, 2002).

La capacité de transport en O₂ d'un organisme est mesurable à travers différents taux métaboliques. Le taux de métabolisme standard (SMR, ou « Standard Metabolic Rate » ; Fry, 1971), correspond au métabolisme nécessaire pour réaliser les activités vitales, comme le fonctionnement de la pompe cardiaque, l'osmorégulation, etc... Le taux de métabolisme maximal (MMR, ou « Maximum Metabolic Rate » ; Fry, 1971), également appelé métabolisme actif (e.g. Lefrançois & Claireaux, 2003), est, quant à lui, atteint par l'organisme en cas d'activité intense comme la locomotion intense ou la digestion. Fry (1971) a défini la différence entre le taux métabolique maximal et standard comme étant la capacité métabolique de l'individu (AS, ou « Aerobic metabolic Scope »). L'AS est ainsi lié à la quantité globale d'énergie qu'un organisme est capable de fournir pour réaliser l'ensemble de ses activités non-obligatoires ou discrétionnaires, et est, de ce fait, souvent appelée « *capacité pour l'activité* ». Parmi les demandes métaboliques auxquelles doit répondre l'animal, les activités de locomotion et de digestion sont considérées

comme étant les plus coûteuses en énergie (Brett, 1964 ; Beamish, 1978 ; Jones & Randall, 1979 ; Tandler & Beamish, 1979 ; Jobling, 1981 ; Soofiani & Hawkins, 1982 ; McCue, 2006 ; Jordan & Steffensen, 2007). Plusieurs auteurs ont mis en évidence chez les poissons, une augmentation de leur consommation d'oxygène (MO_2) proportionnelle au carré de leur vitesse de déplacement (Fry, 1947, 1971 ; Brett & Groves, 1979 ; Jones & Randall, 1979). L'ingestion de nourriture, quant à elle, est suivie d'une augmentation significative du taux métabolique (Tandler & Beamish, 1979 ; Jobling, 1982). Cette augmentation, couramment nommée Action Spécifique Dynamique (SDA, ou « systemic dynamic action »), caractérise l'ensemble des coûts énergétiques impliqués dans l'ingestion, la digestion, l'absorption et l'assimilation des aliments (Jobling, 1994 ; Secor, 2008). Des études sur la truite *Oncorhynchus mykiss* et sur la morue *Gadus morhua* ont par exemple démontré que l'amplitude de la SDA correspondait à une augmentation de 1,5 à 2 fois le métabolisme standard (Herbing & White, 2002 ; Eliason *et al.*, 2008). De la capacité métabolique de l'individu va donc dépendre sa capacité à répondre aux besoins énergétiques importants que réclament ses activités en général, et, particulièrement, ces deux activités particulièrement coûteuses.

Durollet *et al.* (2015, *soumis*, Chapitre 3) a observé chez le téléostéen *Nothobranchius furzeri* que la capacité métabolique au cours de la vie décrivait une courbe gaussienne (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), l'organisme entrant dans sa phase de sénescence présentant une diminution progressive de sa capacité métabolique. Le déclin observé au-delà de l'âge optimal a été imputé à une baisse progressive du nombre et de la fonctionnalité des mitochondries, amenant à une performance réduite de l'organisme à produire de l'énergie (Phillips *et al.*, 2000). Or, la réduction de la capacité métabolique d'un individu a notamment pour effet de diminuer les performances de l'organisme (Fry, 1971 ; Priede, 1985 ; Claireaux & Lefrançois, 2007 ; Pörtner & Farrell, 2008 ; Jourdan-

Pineau *et al.*, 2010). En effet, en réponse à la réduction de l'énergie disponible, chaque espèce peut présenter une stratégie d'allocation énergétique qui lui est propre. Cela se traduit par une baisse d'investissement envers certaines activités. Par exemple, en réponse à une réduction de l'AS causée par une baisse de température, une diminution de l'activité de nage spontanée a été observée chez la carpe *Carassius carassius* (Nilsson *et al.*, 1993 ; Pang *et al.*, 2011), et l'esturgeon *Acipenser transmontanus* (Crocker & Cech Jr, 1997), ainsi qu'une baisse de la vitesse de nage critique chez le saumon *Oncorhynchus nerka* (Brett & Glass, 1973) ou encore le bar *Dicentrarchus labrax* (Claireaux *et al.*, 2006). Alternativement, la digestion fait partie des activités réduites chez certaines espèces en cas de diminution de l'AS, comme cela a été observé chez trois cyprinidés *Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* et *Spinibarbus sinensis* (Pang *et al.*, 2011). De plus, il a été noté que pour minimiser les dépenses énergétiques, certaines espèces réduiraient leur prise alimentaire, diminuant ainsi la consommation d'oxygène lors de la SDA (Chabot & Dutil, 1999 ; Jordan & Steffensen, 2007).

Lors d'une nage intense chez des individus en cours de digestion, les salmonidés tels que la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* et le saumon quinnat *Oncorhynchus tshawytscha* ne varient pas leur MMR, mais vont avoir une vitesse de nage critique réduite par rapport à des individus à jeun (Alsop & Wood, 1997 ; Thorarensen & Farrell, 2006). Ceci traduit une réallocation de l'énergie dédiée à la locomotion au profit de l'activité de digestion, priorisée chez cette espèce. A contrario, la morue charbonnière *Anopoma fimbria* privilégie la locomotion au dépend de la digestion lorsque les deux activités interviennent simultanément. Les poissons alimentés vont, le temps de la nage, allouer leur surplus énergétique, ou puissance métabolique, préférentiellement aux muscles locomoteurs, et stopper momentanément la demande d'oxygène de la SDA (Furnell, 1987). Le bar *Dicentrarchus labrax* a, quant à lui, une stratégie énergétique différente. En cas de nage et

de digestion simultanées, cette espèce est capable d'assumer en parallèle ces deux activités (*i.e.* sans conflit entre locomotion et digestion). Le MMR peut alors être augmenté afin de pouvoir répondre aux deux demandes métaboliques (Jourdan-Pineau *et al.*, 2010).

La présente étude a pour objectif de déterminer si le déclin de la capacité métabolique au cours du vieillissement de *Nothobranchius furzeri* s'accompagne d'une diminution de la prise alimentaire, de la SDA et des performances de nage, ou si les organismes mettent en place une stratégie d'allocation énergétique privilégiant l'une ou l'autre activité. Par ailleurs, la réduction de température est un facteur environnemental connu pour prolonger la durée de vie des ectothermes à travers l'abaissement de leur température corporelle (Ragland & Sohal, 1975 ; Valenzano *et al.*, 2006b ; Hemmer-Brepson *et al.*, 2014). Durollet *et al.* (2015), ont mis en évidence le fait qu'une réduction de la température, non seulement accroît la durée de vie de *Nothobranchius furzeri*, mais décale aussi l'âge métabolique optimal, tout en ralentissant le déclin de la capacité métabolique au cours de sa vie (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** ; Chapitre 3). Le deuxième objectif de cette étude est donc d'élucider si les différentes variations température-dépendantes de la longévité et de la capacité métabolique sont associées, chez les individus sénescents, à une stratégie d'allocation énergétique particulière concernant les activités de prise alimentaire, de digestion et de nage, en cas d'acclimatation à température basse.

4.6 Matériels et Méthodes

4.6.1 Matériel biologique

L'élevage de *Nothobranchius furzeri* de la souche MZM 0410 (Terzibasi *et al.*, 2008) s'est effectué au sein du laboratoire LIENSs (Littoral, Environnement & Sociétés) comme décrit dans les chapitres précédents. De l'éclosion au 10^{ème} jour post-éclosion, les larves sont nourries 2 fois par jour avec des *nauplii* d'*Artemia salina* nouvellement écloses. Chaque jour, la moitié de l'eau des bacs larvaires est renouvelée, la conductivité est ainsi progressivement augmentée de ~200 $\mu\text{S}/\text{m}$ lors de l'éclosion à ~1300 $\mu\text{S}/\text{m}$ au 10^{ème} jour post-éclosion. Une fois cette conductivité atteinte, les poissons sont rassemblés en groupe de 30 individus par aquarium (L x l x h: 0,50 x 0,30 x 0,25 m). Les animaux sont ainsi maintenus du 10^{ème} jour post-éclosion à leur mort dans de l'eau déionisée, additionnée de sel artificiel afin d'obtenir une conductivité de ~ 1300 $\mu\text{S}/\text{m}$. Comme décrit précédemment, les poissons étaient acclimatés à deux températures : $25,6 \pm 0,5$ °C et $22,1 \pm 0,8$ °C. Les poissons étaient ensuite nourris deux fois par jour avec des larves de chironomes fraîchement décongelées, et exposés à une photopériode de 12 heures par jour.

Le suivi individuel a été réalisé sur les poissons isolés par couple, et dont la reproduction, la croissance et le métabolisme a également été suivi. De plus, sur ses mêmes individus, la SDA et les locomotions critique et de routine ont été caractérisées. Le protocole et le système d'élevage particuliers à ces individus ont été précédemment présentés au sein du chapitre 4.3.1. Le nombre de couple testé était de 16 et 14, respectivement à 22 et 26 °C.

Afin d'évaluer les possibles stratégies individuelles, les niveaux d'activités de locomotion et de l'alimentation ont été évalués via la mesure d'un ensemble de variables. Concernant

l'alimentation, la prise alimentaire spontanée, la SDA et la composition énergétique des fèces ont été estimés. L'activité de locomotion à quant à elle été étudiée au travers de la mesure de la vitesse de nage spontanée, ainsi que de la vitesse de nage critique de chaque individu (Table IV. 4).

Table IV. 4 Chronologie des expérimentations réalisées au cours de la présente étude afin de mesurer les différentes variables au cours du vieillissement de *N. furzeri*. ★ représente les âges auxquels ont été mesurées la SDA, les vitesses de nage critiques et spontanées ; ■ symbolise les périodes pendant lesquelles a été suivie la prise alimentaire et ont été récoltés les fèces.

	Stade adulte																	Stade sénescence											
âge (semaines)	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38				
Prise alimentaire																													
Récolte de fèces																													
SDA																													
Vitesse de nage critique																													
Vitesse de nage spontanée																													

4.6.2 Prise alimentaire spontanée

La prise alimentaire de chaque couple a été suivi sur deux périodes au cours du cycle de vie : 1) de 14 à 20 semaines, considérées comme représentative de l'âge adulte, et entourant l'âge métabolique optimal de cette espèce acclimatée à sa température optimale (*i.e.* 19 semaines à 26 °C ; Durollet *et al.*, 2015, *soumis*) ; et 2) de 30 à 36 semaines, période de vie correspondante au stade sénescence (Table IV. 4).

Pour chaque période suivie, la masse des chironomes ingérée par couple à chacun des deux repas quotidiens était quantifiée (en g). Pour cela, à chacun des nourrissages, et pour chacun des couples, un eppendorf était préalablement rempli de chironomes puis pesé. Ensuite, les chironomes étaient progressivement proposés *ad libitum* aux couples. Après cette phase de distribution alimentaire, les eppendorf étaient pesés à nouveaux, et

la différence de masse après chaque repas permettait d'obtenir la masse de vers ingérée par couple. Pour chacune des deux périodes suivies et pour chacun des couples, la masse moyenne de chironomes ingérée par jour a été calculée. Ceci a été effectué pour chacune des températures expérimentales.

4.6.3 Analyse des fèces

Toujours sur les mêmes périodes d'âge (*i.e.* de 14 à 20 semaines, puis de 30 à 34 semaines ; Table IV. 4), une analyse du contenu calorique des fèces a été effectuée. Afin de prendre soin de ne prélever que les fèces, et non des chironomes n'ayant pas été ingérés, la récolte s'effectuait antérieurement à chacun des repas. Les fèces de chaque aquarium étaient prélevés à l'aide d'une pipette, tamisés, placés dans un eppendorf, puis pesés afin d'obtenir la masse fraîche de fèces (en g). Les eppendorf étaient ensuite immédiatement stockés au congélateur à - 20 °C. Une fois l'ensemble des fèces collectés sur les deux périodes suivies, le contenu de chaque eppendorf a été lyophilisé pendant 72 h, puis la masse de matière sèche de chaque eppendorf pesée (en mg). Ensuite, les fèces lyophilisés étaient regroupés par semaine de récolte, broyés, puis tassés afin d'obtenir une pastille. Chaque pastille était pesée (en mg), puis insérée dans le calorimètre (PARR6672 calorimetric thermometer) afin d'estimer le nombre de calories contenues dans chaque pastille correspondant à une semaine de récolte de fèces. La composition énergétique des fèces de chaque pastille a été exprimée en KJ.g^{-1} de matière fraîche.jour⁻¹.individu⁻¹. Pour chaque période suivie, les données de chacun des réplicats par température ont été ensuite moyennées afin d'obtenir une valeur moyenne de composition énergétique par individu par jour.

4.6.4 Caractérisation de la SDA

L'action spécifique dynamique (SDA) de chaque individu a été estimée au travers de la mesure de différentes variables aux âges de 20 puis 36 semaines (Table IV. 4) : la consommation totale d'oxygène au cours du processus de digestion comme indicateur de l'énergie nécessaire à la SDA ; la durée de la SDA représentant la durée de la digestion du repas ; la consommation maximale d'oxygène au cours de la digestion, ou pic de MO_2 ; et le temps entre la prise alimentaire et le pic de consommation d'oxygène qui renseigne sur la cinétique de digestion du poisson (Secor, 2008 ; Dupont-Prinet *et al.*, 2009 ; Jourdan-Pineau *et al.*, 2010, Figure II. 9).

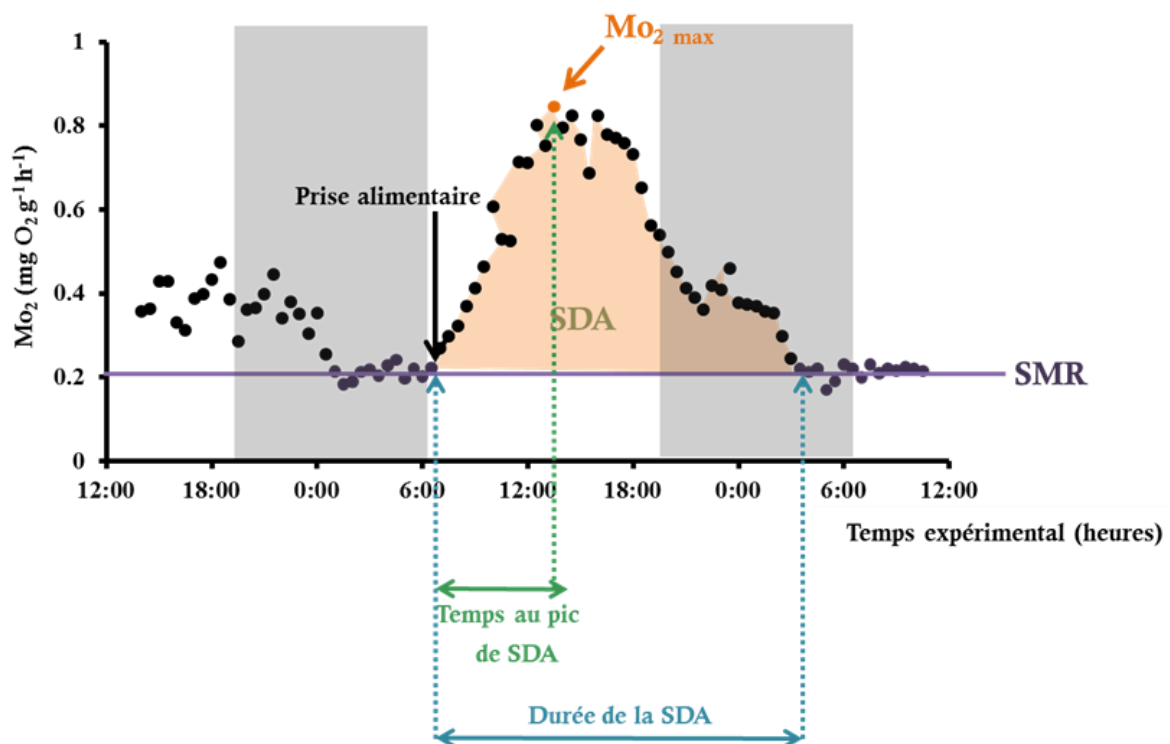


Figure II. 12 Analyse graphique de la SDA. La magnitude de la SDA est représentée en rose-orangé. Le $MO_{2\max}$ représente la valeur maximale de MO_2 atteinte durant la SDA, à laquelle est soustraite la valeur de SMR (représentée par un trait violet). La SDA est également caractérisée par sa durée et par le temps entre la prise de nourriture et la $MO_{2\max}$. Les points bleus représentent les moments où le poisson était en SMR. Les bandes verticales grises correspondent aux nuits et les blanches aux journées.

a. Système expérimental

Huit respiromètres (diamètre : 7,50 cm ; volume : 174 mL ; Figure II. 8) à flux intermittent, similaires aux respiromètres utilisés lors de l'étude présentée au chapitre 3, ont été modifiés afin de permettre le nourrissage des poissons tout en engendrant un minimum de stress : un bouchon étanche a été ajouté au-dessus de chaque respiromètre permettant l'insertion de nourriture. Par ailleurs, une grille positionnée à 2 cm recouvre la totalité du fond des respiromètres ; permettant la sédimentation et la non accessibilité aux poissons des vers non ingérés. Le même dispositif expérimental que celui décrit dans le chapitre 4. 3.2. était utilisé pour mesurer la consommation d'oxygène de chacun des poissons.

b. Protocole

Les poissons à jeun depuis 24 h étaient individuellement placés dans un des 8 respiromètres à flux intermittent durant 36 h, pendant lesquelles une succession de phase de renouvellement d'oxygène (15 min) et de mesure de la pression partielle d'oxygène (15 min) était respectée. Les poissons étaient nourris 20 h après le début de l'expérience (*i.e.* ~10 h du matin) ; cela permettait de respecter l'heure à laquelle étaient habituellement nourris les poissons dans leurs aquarium, et de les nourrir après une période suffisante d'acclimatation. Des chironomes étaient proposés un à un à chaque poisson, via l'ouverture permise par le bouchon présent sur le dessus de chaque respiromètre. La masse des chironomes était pesée avant et après l'alimentation afin d'obtenir la ration alimentaire pour chaque individu, *i.e.* la masse de vers ingérés. Suite à cela, les individus étaient laissés sans aucune perturbation pendant 24 h, au cours desquelles la MO_2 était mesurée de façon automatisée.

c. Calcul de la consommation d'oxygène et de la SDA

Comme dans les études précédentes, la consommation d'oxygène (MO_2) est exprimée en $mgO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$, et calculée selon la formule suivante :

$$MO_{2meas} = \frac{\Delta[O_2] \cdot V}{\Delta t \cdot M_{meas}} \quad \text{equation (2)}$$

où $\Delta[O_2]$ (en $mgO_2 \cdot l^{-1}$) correspond à la variation de la concentration en oxygène au cours d'une phase de mesure Δt (en h) et V (en l) est le volume du respiromètre auquel est soustrait le volume du poisson, M_{meas} (en g) est la masse du poisson mesuré. Afin de corriger MO_{2meas} de tout effet de la ration alimentaire ingérée par chaque poisson, les données ont été standardisées par rapport à 1 g de matière fraîche ingérée.

Puis, afin de s'affranchir de potentiel effet de taille du poisson sur la consommation d' O_2 , MO_{2meas} a été corrigée à l'aide de la relation allométrique suivante :

$$MO_{2cor} = MO_{2meas} \cdot (M_{meas} \cdot M_{cor}^{-1})^{1-b} \quad \text{equation (3)}$$

où MO_{2cor} (en $mgO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$) correspond à la consommation d'oxygène rapporté à un poisson standard de 1 g (M_{cor}), MO_{2meas} (en $mgO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$) est la consommation d'oxygène calculée pour chaque individu dont la masse était $M_{(meas)}$ (en g) et b est le coefficient allométrique décrivant la relation entre consommation d'oxygène et masse du poisson.

La SDA de chaque individu a été obtenue en calculant l'intégrale sous la courbe décrite par la MO_2 qui augmente suite à la prise alimentaire (Figure II. 9). La base de la courbe correspondait à la valeur de SMR du poisson testé. Le SMR a été calculé en utilisant les valeurs de MO_2 sur deux périodes différentes : 1) 12 h après que les individus aient été placés dans les respiromètres et jusqu'à leur alimentation, puis 2) les valeurs allant de la

fin de la digestion à la fin de l'expérimentation. L'ensemble de ces données utilisées pour le SMR a une distribution bimodale en raison d'une variation de l'activité du poisson dans le respiromètre, alternant entre activité minimale et de routine ; ainsi la valeur de distribution la plus basse a été considérée comme étant la valeur de SMR (Figure II. 7). Soustraire le SMR de l'estimation de la SDA permettait de ne pas y inclure la MO_2 associée aux fonctions vitales de l'organisme (*e.g.* fonctionnement de la pompe cardiaque, osmorégulation, ...), et ainsi de prendre en compte uniquement l'augmentation postprandiale de la MO_2 . La durée de la SDA a été relevée pour chaque poisson testé (*i.e.* Temps écoulé depuis la prise alimentaire et jusqu'au retour au SMR ; en heure décimale). Le pic de MO_2 correspondant à la consommation d'oxygène la plus élevée au cours de la digestion des individus et le temps nécessaire à chaque individu pour atteindre cette valeur ont également été notés (Figure II. 9).

4.6.5 Locomotion

4.6.5.a Vitesse de nage critique

La performance de nage de chaque individu testé a été caractérisée grâce à la mesure de sa vitesse de nage critique à deux âges différents, 22 et 38 semaines (Table IV. 4).

a. Système expérimental

Afin de soumettre les poissons à un test de nage, ils ont été placés individuellement dans un tunnel de nage de type Brett (Brett, 1964) modifié de 1500 mL (Loligo system, Denmark). Ce tunnel comportait une chambre de nage adaptée à la taille des poissons. Le courant régulier du tunnel (Figure II. 10) y était créé par une hélice entraînée par un

moteur régulé via un potentiomètre. De plus, deux structures en nid d'abeille étaient positionnées en amont et en aval de la chambre de nage, afin d'y assurer un flux laminaire. Le tunnel de nage était plongé dans un bac tampon de 40 L, rempli d'eau désionisée complétée de sel artificiel ($\sim 1300 \mu\text{S/m}$). La température de l'eau du bac était maintenue à 22 ou 26 °C, en fonction de la température d'acclimatation du poisson subissant le test de nage. Le renouvellement d'eau du tunnel de nage était permis par une pompe de renouvellement positionnée dans le bac tampon.

b. Protocole

Le protocole suivi lors du test de nage en lui-même est celui proposée par Brett (1964) et repris par la suite par de nombreux auteurs (*e.g.* Soofiani & Priede, 1985 ; Reidy *et al.*, 2000 ; Claireaux *et al.*, 2005 ; Lefrançois *et al.*, 2005 ; Vagner *et al.*, 2014). Il fait appel à la réponse « rhéotropisme négatif » qui consiste, pour le poisson, à se maintenir à une position fixe dans un courant d'eau (Beamish 1979) : le poisson est soumis à une augmentation progressive du courant par paliers. Chaque individu, à jeun depuis 24 h, a été placé en acclimatation dans le tunnel de nage pendant 2 h, avec un courant faible de 2 BL.s^{-1} (en longueur corporelle par sec, « body length » per sec en anglais) ne fatiguant pas le poisson. Suite à cela, le test de nage est commencé selon les caractéristiques suivantes : la période totale d'un palier était de 25 min, réparties en 5 min de renouvellement d'eau pendant laquelle la vitesse du courant était progressivement augmentée jusqu'à la valeur correspondant au palier suivant (+ 0,5 BL.s^{-1}), puis 20 min de nage. L'expérience se termine lorsque le poisson était considéré comme épuisé, *i.e.* lorsqu'il n'arrivait plus à nager contre le courant et restait collé au nid d'abeille pendant au moins 1 min. Le courant est alors diminué jusqu'à 0,5 BL.s^{-1} , s'en suit une période de récupération d'1,5 h.

Enfin, l'individu est extrait du tunnel de nage, et anesthésié à l'aide de MS-222 (Tricaine mesylate; 1,5 g l⁻¹). Ses longueurs standard et totale, ainsi que sa masse sont mesurées.

c. Calcul de la vitesse de nage critique

La vitesse de nage critique U_{crit} (BL.s⁻¹) de chaque poisson a été calculé suivant la formule de (Brett, 1964) :

$$U_{crit} = U_t + t_1 \cdot t^{-1} \cdot U_1 \quad \text{equation (1)}$$

Où U_t (en BL.s⁻¹) correspond à la plus haute vitesse maintenue pendant la durée totale d'un palier, t_1 (en min) est le temps pendant lequel le poisson est resté au palier où l'épuisement est atteint, t (en min) est la durée de chaque période de nage (20 min pour cette étude), et U_1 est l'augmentation de la vitesse entre chaque palier (0,5 BL.s⁻¹).

d. Calcul de la MO_{2max}

La MO_{2max} correspond à la consommation d'oxygène du poisson lorsqu'il atteint sa vitesse maximale de nage (Brett, 1964 ; Figure II. 11). La consommation d'oxygène était calculée d'après la formule présentée dans le paragraphe 4.7.4 c. de ce chapitre, dans le protocole du calcul de la consommation d'oxygène au cours de la SDA.

4.6.5.b Locomotion de routine

La locomotion de routine a été analysée au travers de la mesure de la vitesse moyenne de nage de routine ($U_{routine}$) de chaque individu à l'âge de 20 puis de 36 semaines (Table IV. 4). Pour cela, les poissons isolés par couple ont été filmés pendant 28 h.

a. Système expérimental

Le système expérimental utilisé est celui décrit dans le chapitre 4.3.2.2.c. Brièvement quatre aquarium (L x l x h : 0,33 x 0,24 x 0,30 m) ont été utilisés en parallèle afin de filmer quatre couples simultanément. Afin de pouvoir suivre les individus tout au long de la manipulation, il a été pris soin de ne pas permettre aux poissons de se cacher dans des recoins ou sous des zones ombragées. Grâce à deux lumières infrarouges installées dans chacun des aquariums, il était possible de filmer pendant la nuit sans perturber le rythme nyctéméral des poissons. Chacun des aquariums était filmé avec une caméra monochrome IDS UI-3240CP-NIR-GL, avec une lentille de 2 mégapixel Ricoh FL-CC0614A-2M. Une succession de vidéo de 5 min, ayant toutes un rythme de 10 images par secondes et de format AVI était enregistrée tout au long de l'expérimentation (*i.e.* 336 vidéos par couple ont ainsi été produites).

b. Tracking

Les vidéos pendant lesquelles avait lieu le passage jour/nuit étaient systématiquement exclues de l'analyse. N'ont été utilisées que les vidéos au cours desquelles les couples ne subissaient pas de perturbation (*e.g.* alimentation). Ensuite, parmi les vidéos restantes, deux vidéos par heure étaient sélectionnées aléatoirement. Le déplacement de chaque individu a ainsi été suivi grâce au logiciel Idtracker (Pérez-Escudero *et al.*, 2014), permettant d'obtenir la position des poissons pour chaque image en coordonnées (x ; y). Avec ces coordonnées, a été calculée pour chaque individu une vitesse de nage instantanée ($BL.s^{-1}$; BL pour longueur corporelle ou « body length » en anglais). Ensuite, pour chacun des individus, une valeur moyenne de vitesse de nage de routine par sec ($U_{routine}$) était calculée. Afin de standardiser les données, $U_{routine}$ a été exprimé en longueur corporelle par seconde ($BL.s^{-1}$).

4.6.6 Statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statistica. La normalité (test de Kolmogorov-Smirnov) et l'homoscédaticité (test de Bartlett) des données ont été vérifiées et approuvées. Un test ANOVA à deux facteurs a été utilisé pour déterminer la significativité des effets de l'âge et de la température sur les différentes variables mesurées. Les résultats sont considérés significatifs lorsque $p < 0.05$.

4.7 Résultats

4.7.1 Prise alimentaire et fèces

La prise alimentaire varie significativement en fonction de l'âge des poissons, quelle que soit leur température d'acclimatation (ANOVA deux facteurs ; effet de l'âge : $p\text{-value} = 0,542 \times 10^{-3}$; effet combiné âge * température : $p\text{-value} = 0,883$; Figure IV. 5A). La diminution observée est de l'ordre de grandeur de 2 et 1,5 chez les individus acclimatés à 22 et 26 °C. Par ailleurs, la réduction de la température s'est accompagnée d'une diminution significative de la prise alimentaire des individus (ANOVA deux facteurs ; effet de la température : $p\text{-value} = 0,214 \times 10^{-6}$; Figure IV. 5A). Un test de Spearman a mis en évidence que la prise alimentaire de chaque individu sénéscent dépendait de la quantité de nourriture ingérée par l'individu entre 14 et 20 semaines ($p\text{-value} = 0,469 \times 10^{-1}$) ; les couples qui se nourrissaient le plus au stade adulte, l'étaient toujours au stade sénéscent.

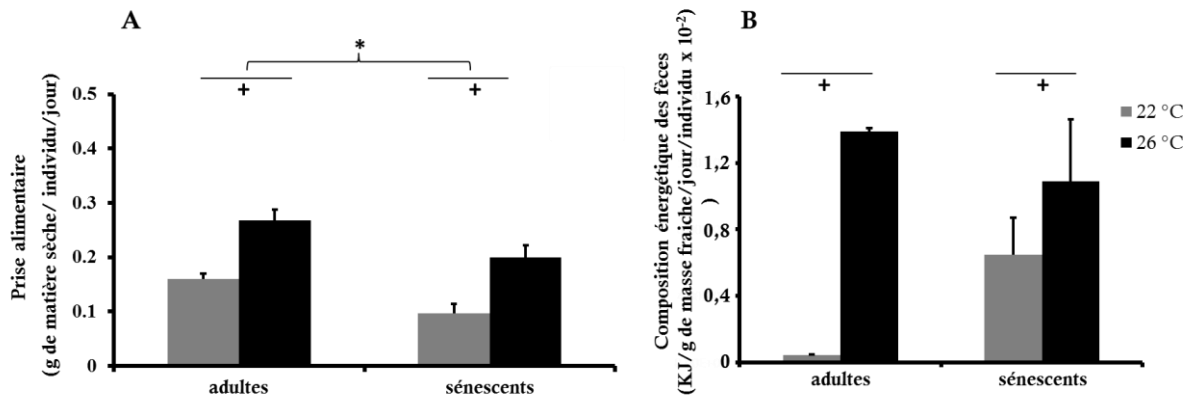


Figure IV. 5 **A)** Prise alimentaire (moyenne \pm ES), et **B)** Composition énergétique des fèces (moyenne \pm ES) en fonction de l'âge chez des couples de *Nothobranchius furzeri* acclimatés à 22 et 26 °C (22 °C : N_{couple} = 16 et 7 respectivement chez les individus âgés de 14 à 18 semaines, puis de 30 à 34 semaines ; 26 °C : N_{couple} = 14 et 9 respectivement chez les individus âgés de 14 à 18 semaines, puis de 30 à 34 semaines). + représente un effet significatif de la température ; * symbolise un effet significatif de l'âge sur la prise alimentaire (ANOVA deux facteurs, p-value < 0,05). Aucun effet combiné entre ces deux facteurs n'a été observé.

La composition énergétique des fèces ne diffère pas significativement en fonction de l'âge des individus (ANOVA deux facteurs, p-value = 0,723 ; Figure IV. 5B). Au contraire, les individus, dont la température d'acclimatation était réduite, ont produit des fèces dont la composition énergétique était significativement plus basse que celle des poissons acclimatés à 26 °C, et ce, quel que soit leur âge (ANOVA deux facteurs, effet de la température : p-value = $0,424 \times 10^{-1}$; effet combiné âge * température : p-value = 0,299 ; Figure IV. 5B).

4.7.2 Caractérisation de la SDA

La consommation totale d'oxygène au cours de la SDA est significativement diminuée par l'état de senescence du poisson et par la diminution de la température. Aucun effet interactif des deux facteurs n'a été par contre mis en évidence (ANOVA deux facteurs ;

âge : $p\text{-value} = 0,136 \times 10^{-3}$; température : $p\text{-value} = 0,114 \times 10^{-1}$; âge * température : $p\text{-value} = 0,383$; Figure IV. 6.A).

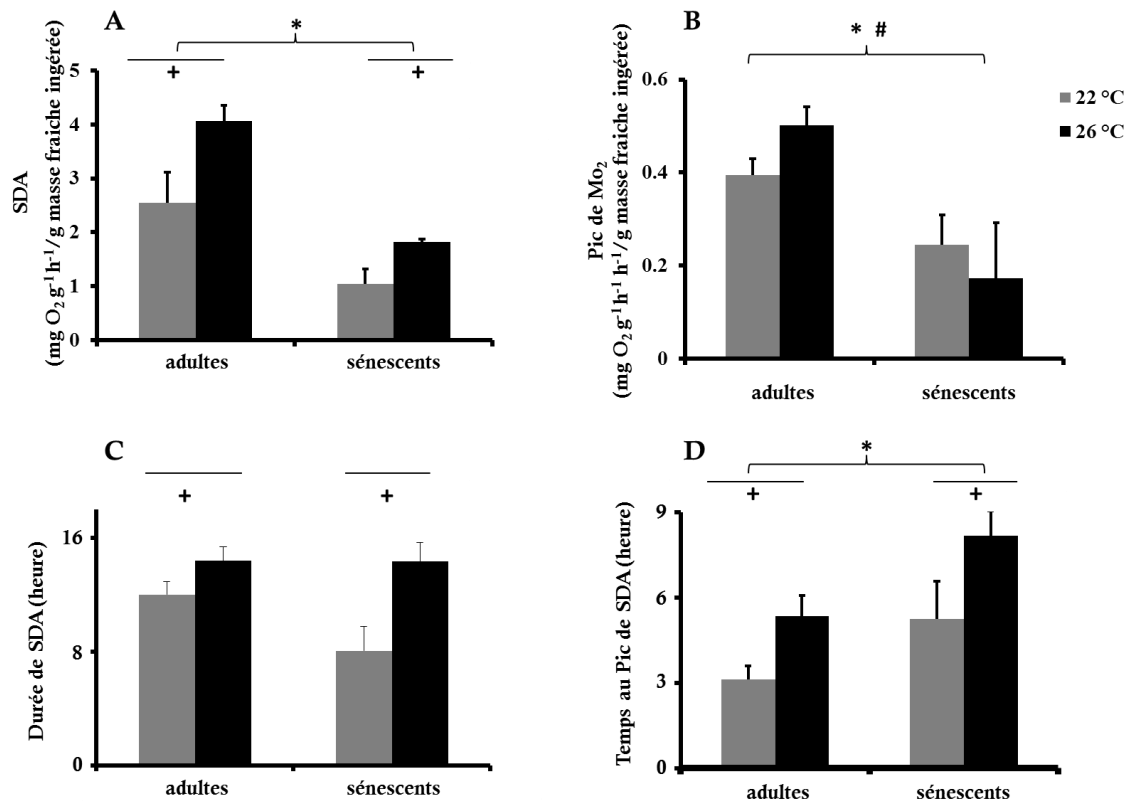


Figure IV. 6 **A**) Action spécifique dynamique (SDA ; moyenne \pm ES), **B**) Consommation maximale d'oxygène au cours de la digestion (MO₂ pic ; moyenne \pm ES), **C**) Durée de la SDA (moyenne \pm ES), et **D**) Temps entre la prise alimentaire et la MO₂ pic au cours de la SDA (Temps au Pic de SDA ; moyenne \pm ES) en fonction de l'âge chez des couples de *Nothobranchius furzeri* acclimatés à 22 et 26 °C (22 °C : N_{tot} = 12 et 6 chez des individus âgés respectivement de 20 puis 36 semaines ; 26 °C : N_{tot} = 10 et 6 chez des individus âgés respectivement de 20 puis 36 semaines). + et * représentent respectivement l'effet significatif de la température et de l'âge sur la SDA ; # représente la présence d'un effet combiné de l'âge et de la température, mis en évidence par une ANOVA deux facteurs ($p\text{-value} < 0,05$).

Le pic de MO₂ au cours de la SDA a été significativement diminué au cours du vieillissement de *Nothobranchius furzeri* (ANOVA deux facteurs ; effet de l'âge : $p\text{-value} = 0,538 \times 10^{-3}$; Figure IV. 6B). De plus, la baisse de température d'acclimatation a modifié la variation du pic de MO₂ au cours du vieillissement (ANOVA deux facteurs ; effet de la température : $p\text{-value} = 0,799$; effet combiné âge * température : $p\text{-value} = 0,494 \times 10^{-1}$; Figure IV. 6B). En effet la diminution du pic de MO₂ observée au cours du vieillissement

chez les poissons acclimatés à 22 °C est bien moins importante que celle constatée chez les individus acclimatés à 26 °C (*i.e.* le pic de MO_2 au stade sénescant correspond à 38% et 64 % du pic de MO_2 au stade adulte, à 22 et 26 °C respectivement).

La durée totale de la SDA n'a varié significativement qu'en fonction de la température d'acclimation des poissons : ceux acclimatés à 22 °C ont eu un temps de SDA plus court que les individus acclimatés à 26 °C (*i.e.* 14% et 43% plus court à 22 qu'à 26 °C pour les adultes et les sénescants, respectivement ; ANOVA deux facteurs ; effet de la température : $p\text{-value} = 0,164 \times 10^{-1}$; Figure IV. 6C). Au contraire, aucun effet de l'âge n'a été démontré sur le temps nécessaire aux poissons pour digérer (ANOVA deux facteurs ; effet de l'âge : $p\text{-value} = 0,115$; effet combiné âge * température : $p\text{-value} = 0,123$; Figure IV. 6C).

Le temps au pic de SDA a, quant à lui, augmenté avec le vieillissement des animaux, et ce quelle que soit la température d'acclimation (ANOVA deux facteurs ; effet de l'âge : $p\text{-value} = 0,483 \times 10^{-1}$; effet combiné âge * température : $p\text{-value} = 0,673$; Figure IV. 6D). La réduction de la température d'acclimation a engendré une diminution significative du temps nécessaire pour atteindre ce pic (ANOVA deux facteurs ; effet de la température : $p\text{-value} = 0,348 \times 10^{-2}$; Figure IV. 6D).

4.7.3 Locomotion

Un test de nage a permis de mesurer la consommation maximale d'oxygène ($MO_{2\max}$) chez des individus réalisant une nage intense, ainsi que leur vitesse de nage critique (U_{crit}). La $MO_{2\max}$ diminue de manière significative entre les stades adulte et sénescant (ANOVA deux facteurs ; effet de l'âge : $p\text{-value} = 0,355 \times 10^{-2}$; Figure IV. 7A). Toutefois, aucun effet combiné entre l'âge et la température n'a pu être mis en évidence

(age*température : p-value = 0,105). La réduction de la température a induit une augmentation de la MO_{2max} . Cette réduction semble être plus importante pour les adultes que pour les sénescents (ANOVA deux facteurs ; effet de la température : p-value = 0,498 x 10⁻¹ ; Figure IV. 7A). Quelle que soit l'âge et la température d'acclimatation des poissons testés, la U_{crit} n'a pas varié (ANOVA deux facteurs ; effet de l'âge : p-value = 0,644 ; effet de la température : p-value = 0,514 ; effet combiné âge * température : p-value = 0,831 ; Figure IV. 7B).

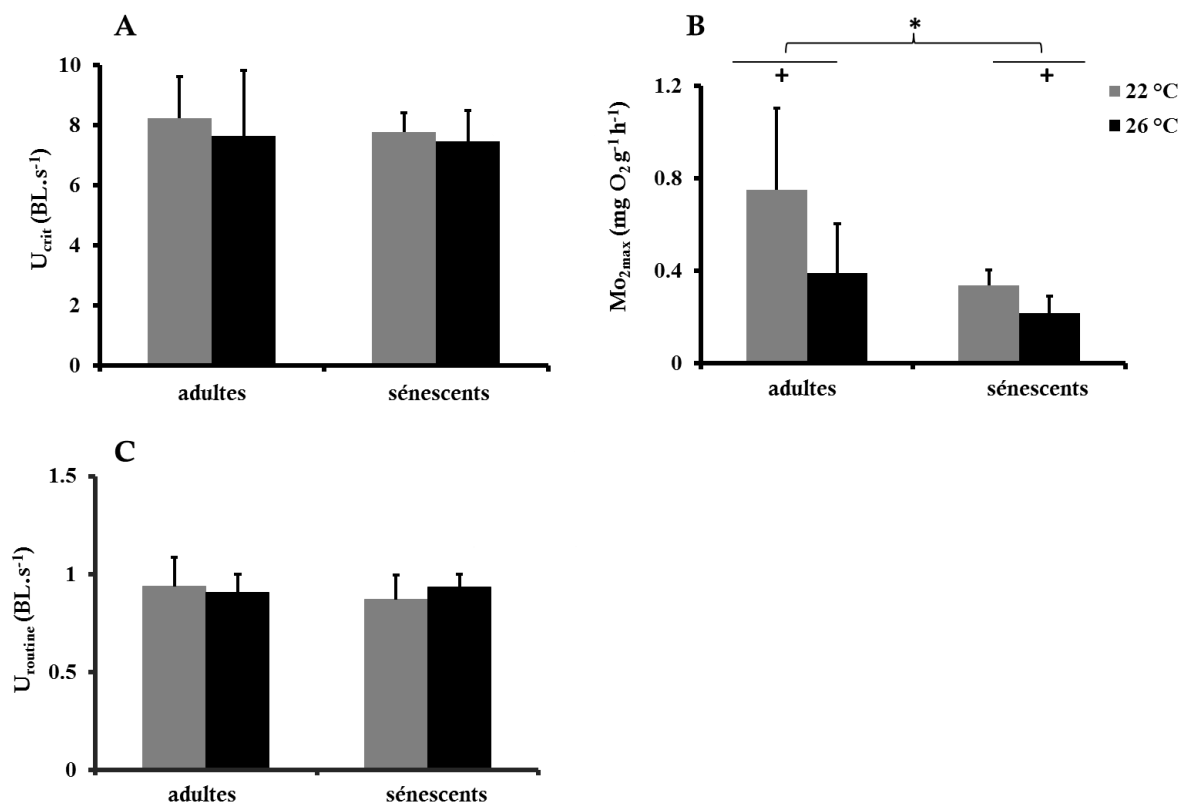


Figure IV. 7 A) Vitesse de nage critique (U_{crit} ; moyenne \pm ES), B) Consommation maximale d'oxygène mesurée lors du test de nage (MO_{2max} ; moyenne \pm ES), et C) Vitesse de nage spontanée ($U_{routine}$; moyenne \pm ES) en fonction de l'âge chez des *Nothobranchius furzeri* acclimatés à deux températures différentes, 22 et 26 °C (22 °C : N_{tot} = 12 et 6 chez des individus âgés de 20 puis 36 semaines ; 26 °C : N_{tot} = 10 and 6 chez des individus âgés de 20 puis 36 semaines). + représente l'effet significatif de la température ; * symbolise l'effet significatif de l'âge sur la prise alimentaire, mis en évidence par une ANOVA deux facteurs (p-value < 0,05).

De la même manière, la vitesse de nage spontanée (U_{routine}) moyenne n'a été significativement impactée ni par l'âge ou par la température d'acclimatation des individus (ANOVA deux facteurs ; âge : p-value = 0,887; température : p-value = 0,907 ; âge * température : p-value = 0,735 ; Figure IV. 7C).

4.8 Discussion

Le premier objectif de cette étude était de mettre en évidence un déclin de la prise alimentaire, de la SDA, ainsi que des performances de nage, associées à la réduction de la capacité métabolique au cours du vieillissement de *Nothobranchius furzeri*. Le second but était d'élucider si la réduction de la température, entraînant un retard et un ralentissement de la phase de déclin de l'AS, était associée à une stratégie d'allocation énergétique particulière. Nous avons constaté que le déclin de l'AS lors de la phase de sénescence est associé à une réduction de la prise alimentaire et de la SDA, ainsi qu'une diminution du taux métabolique maximal mesuré lors d'une nage critique. Bien qu'une réduction de la température s'accompagne d'une baisse des capacités métaboliques, seules la prise alimentaire et la SDA sont réduites par ce traitement, alors que les performances de nage sont maintenues.

La prise alimentaire spontanée des individus a diminué entre les stades adulte et sénéscent (Figure IV. 5A). Certains auteurs ont suggéré que les organismes présentant une réduction de leur AS, diminuaient leur prise alimentaire afin de minimiser les dépenses énergétiques induites par la digestion (Chabot & Dutil, 1999 ; Jordan & Steffensen, 2007). En effet, la réduction observée dans cette présente étude est concomitante avec la baisse de la capacité métabolique observée par Durollet *et al.* (2015, soumis) chez *Nothobranchius furzeri* au cours du vieillissement. La consommation de

nourriture par un organisme dépend en outre d'un ensemble de facteurs (Fletcher, 1984). Chez les téléostéens, il a notamment été démontré que les sensations de faim et de satiété des individus étaient en partie régulées par des facteurs endocriniens d'oréxie et d'anorexie, agissant sur le système nerveux central (Volkoff *et al.*, 2005, 2009). Il est donc possible que le processus de vieillissement détériore le système endocrinien, perturbant la sensation de faim, comme cela est observé chez l'homme (Sturm *et al.*, 2003). Concernant l'efficacité de l'assimilation énergétique des individus, elle n'était pas différente en fonction de l'âge des poissons (Figure IV. 5B). Effectivement, les fèces produites par les individus sénescents avaient un contenu énergétique équivalent aux fèces des poissons adultes. Il était attendu un déclin de l'assimilation énergétique avec le vieillissement en raison des détériorations possibles du système digestif dues au processus de sénescence. En effet, une dégradation de ce système au cours du vieillissement a été observé chez un autre vertébré, l'homme (Kitani, 1990 ; Evers *et al.*, 1994). Le fait que nous n'ayons pas observé de déclin de l'efficacité d'assimilation au cours du vieillissement pourrait être en partie dû à une compensation de l'organisme face à la diminution de la quantité d'aliment ingéré (Figure IV. 5A). Xie *et al.*, (1997) ont observé chez le tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* une augmentation de l'efficacité d'assimilation associée à une diminution de la prise alimentaire. Ils ont imputé cela au fait qu'ayant une quantité d'aliment moindre à digérer, l'assimilation nutritive serait plus efficace.

Une réduction de la température a, quant à elle, entraîné une diminution de la prise alimentaire. Cela a déjà été observé chez d'autres espèces de poissons, qui, en réponse à une réduction de leur capacité métabolique face à une baisse de la température, diminuent leur apport de nutriment (Brett, 1979 ; Burel *et al.*, 1996). Néanmoins, acclimaté à 22 °C, les individus avaient des fèces contenant moins d'énergie comparés aux poissons exposés à une température de 26 °C. La réduction de la température semble

donc être favorable à l'efficacité de l'assimilation des aliments. Ceci peut s'expliquer par une digestion plus lente (*i.e.* temps de transit plus long) et une quantité d'aliment réduite (*c.f.* Figure IV. 5A), permettant d'assimiler plus de nutriments comparée à une digestion qui aurait été plus rapide et donc moins performante.

Etudier le profil métabolique de l'action spécifique dynamique (SDA) permet de quantifier les coûts métaboliques suite à une prise de nourriture (*i.e.* coûts de l'ingestion, de la digestion, de l'assimilation et de l'excrétion). Chez *Nothobranchius furzeri*, bien que la durée de la SDA fût similaire chez les individus adultes et sénescents, la quantité totale d'oxygène mobilisée, ainsi que le taux métabolique postprandial maximal (*i.e.* pic de MO_2) étaient réduites chez les poissons les plus vieux. On peut supposer que la diminution du métabolisme au cours du vieillissement de *N. furzeri* (Durollet *et al.*, 2015, *soumis*) s'est accompagné d'une baisse de l'investissement énergétique, donc d'un déclin de la SDA. La comparaison des résultats obtenus avec d'autres études est limitée, étant donné que l'effet du vieillissement sur la SDA n'a été étudié que chez l'humain (review de Secor, 2008). Cependant, les résultats obtenus convergent également vers un déclin de la SDA lors de la phase sénescence (Morgan & York, 1983 ; Thörne & Wahren, 1990). La réduction de la température d'acclimatation des poissons a induit des modifications du profil métabolique de la SDA, comme cela est le cas chez de nombreuses espèces de vertébrés (review de McCue, 2006 ; Secor, 2008). La quantité d'oxygène mobilisée au cours de la SDA de ces individus était plus faible, de même que leur pic de MO_2 . Ce résultat concorde avec les travaux réalisés sur d'autres espèces ectothermes. En effet, il a été démontré qu'une diminution de la température induisait des changements du profil métabolique postprandial (*i.e.* réduction du pic de métabolisme postprandial), ainsi que d'une réduction de l'efficacité de la digestion et de l'assimilation des aliments (Machida, 1981 ; Robertson *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2002 ; Secor *et al.*, 2007). Plus précisément,

chez la morue *Gadus morhua*, le silure *Silurus meridionalis* et la dorade royale *Sparus aurata*, la réduction de la température conduit à une diminution de la SDA (Soofiani & Hawkins, 1982 ; Guinea & Fernandez, 1997). De plus, la réduction des coûts métaboliques de la SDA est en accord avec la diminution de la capacité métabolique des individus induite par une baisse de la température d'acclimatation chez *N. furzeri* (Durollet *et al.*, 2015, *soumis*, Chapitre 3, **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Concernant le rôle régulateur de la température sur le déclin de la SDA au cours du vieillissement, il semble avoir peu d'influence. En effet, seule la variation du pic de MO_2 au cours du vieillissement est différente chez les poissons acclimatés à 22 °C. Il semble que le déclin plus important de la capacité métabolique des individus acclimatés à 26 °C se répercute uniquement sur le pic de MO_2 . Connaitre la portion du registre métabolique utilisé pour le processus de SDA permet de mettre en évidence de possibles stratégies énergétiques. A 26 °C, les individus âgés de 20 et 36 semaines ont des pics de MO_2 postprandiaux 1,6 fois plus élevés que la capacité métabolique mesurée à des âges approximativement équivalents chez *Nothobranchius furzeri* (i.e. 18 et 36 semaines ; Durollet *et al.*, 2015, *soumis*).

Les mesures de SDA réalisées au cours de cette étude sont cependant à interpréter avec prudence. Bien que les valeurs de SDA aient été standardisées par rapport à une masse ingérée de vers de 1g, la réponse métabolique mesurée était la conséquence de prises alimentaires de rations diverses. En effet, l'alimentation des individus au sein des respiromètres ne s'est pas fait par gavage, comme cela est généralement le cas pour ce genre de mesure (Jordan & Steffensen, 2007 ; Eliason *et al.*, 2008). Les poissons ingéraient la nourriture *ad libitum*. Ceci induit donc que chaque individu a eu un apport nutritif différent. Or, la prise alimentaire spontanée de *Nothobranchius furzeri* était différente selon l'âge et la température d'acclimatation des poissons (Figure IV. 5A). De

nombreuses études ont démontré qu'une diminution de la taille du repas s'accompagne d'une baisse du pic postprandial du métabolisme, de la durée de l'élévation du métabolisme, et de la SDA (d'Alessio *et al.*, 1988 ; Masman *et al.*, 1989 ; Campbell *et al.*, 2000 ; Fu *et al.*, 2005 ; Secor *et al.*, 2007). Ces changements s'expliqueraient par une réduction du temps et de l'effort demandés pour digérer et assimiler une portion alimentaire plus petite.

Outre la SDA, la locomotion est une activité qui peut mobiliser une grande partie de la capacité métabolique d'un organisme. Aucune différence de la vitesse de nage critique (U_{crit}) n'a été observé au cours du vieillissement de *Nothobranchius furzeri* quel que soit la température d'acclimatation. Si U_{crit} dépend de la capacité de l'organisme à utiliser l'oxygène et à fournir l'énergie nécessaire à ce type d'effort prolongé, elle dépend aussi du métabolisme anaérobie. En effet, lorsque la demande métabolique aérobie des muscles rouges dépasse la capacité en oxygène et en nutriments des systèmes respiratoires et cardiovasculaires (Brett, 1964 ; Claireaux *et al.*, 2005), les muscles blancs sont recrutés et le métabolisme anaérobie sollicité (Peake & Farrell, 2004). Ainsi, les individus sénescents devant faire face à une réduction de leur capacité métabolique aérobie, il est probable qu'ils utilisent leurs muscles blancs précocement lors d'une nage intense. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'une diminution du taux métabolique maximal est observée chez les individus sénescents, bien qu' U_{crit} reste constante (Figure IV. 7). L'augmentation maximale du métabolisme pour répondre aux coûts énergétiques d'un test de nage reste inférieure à la capacité métabolique des individus acclimatés à 26 °C (Durollet *et al.*, 2015, *soumis*, Chapitre 3). La réduction de la température change cependant ce schéma. En effet, dans ce cas, les individus ont eu une MO_{2max} lors du test de nage bien supérieur à leur capacité métabolique, notamment les adultes (*i.e.* 2,6 fois et 1,1 fois supérieure à l'AS chez les adultes et les sénescents respectivement).

La vitesse de nage de routine (U_{routine}) a également été estimée au cours du vieillissement de *Nothobranchius furzeri* (Figure IV. 7C). Tout comme U_{crit} , aucune variation de U_{routine} n'a été observée entre les poissons adultes et sénescents et selon leur température d'acclimatation. Ces résultats contredisent la majorité des autres travaux étudiant les changements de U_{routine} au cours du vieillissement, mettant en évidence un déclin de la locomotion (Le Bourg, 1987 ; Fernández *et al.*, 1999 ; Hillerås *et al.*, 1999 ; Scimonelli *et al.*, 1999 ; Minois *et al.*, 2001 ; Siwak *et al.*, 2002 ; Gilbert *et al.*, 2014). Parmi ces auteurs, certains ont imputé le déclin âge-dépendant de la locomotion de routine à des dégénération des systèmes nerveux central et périphérique ; d'autres ont supposé que cette détérioration pouvait être causé par une réduction de la capacité pour l'activité (ou capacité métabolique) due au processus de vieillissement. Dans ce chapitre de thèse, nous avons mis en évidence que le temps consacré aux interactions entre le mâle et la femelle *Nothobranchius furzeri* n'était pas réduit au cours de la sénescence (Chapitre 4 – Partie 1.3.4 ; Figure IV. 4D). Ce comportement correspond à la poursuite de la femelle par le mâle, dans le but de stimuler la ponte. Ainsi, le comportement reproductif de cette espèce se répercute sur la nage de routine qui a été mesurée pour chaque individu d'un couple. Ce résultat pourrait en partie expliquer la non-dégradation la nage de routine au cours de la sénescence : l'activité de locomotion de routine, caractérisée au travers de la mesure de la vitesse de nage, serait lié à l'activité de reproduction chez cette espèce. Etant donnée la durée de vie extrêmement courte de cette espèce, ainsi que l'importance de la phase embryonnaire enkystée pour la survie lors des épisodes de sécheresse des mares, l'efficacité de la reproduction est donc un élément essentiel à sa survie de la population. La nage étant une activité fondamentale dans le comportement et processus de reproduction, il paraît logique que cette fonction soit maintenue malgré le déclin de la capacité métabolique avec l'âge

Pour conclure, le processus de sénescence chez *N. furzeri* est associé à une réduction de la prise alimentaire et de l'investissement métabolique envers la SDA, possiblement liées à la baisse de la capacité métabolique observée par Durollet *et al.*, (2015, soumis, Chapitre 3, **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Concernant la locomotion, la vitesse de nage critique ne varie pas au cours du vieillissement chez *N. furzeri*. Cependant, le taux métabolique maximal mesuré lors d'une nage critique est réduit chez les individus sénescents. Ces deux résultats supposent que les individus les plus âgés garderaient une vitesse de nage critique identique aux adultes via une utilisation précoce de la nage anaérobie. Il serait donc intéressant de mesurer la dette en oxygène des poissons afin de répondre à cette hypothèse. La vitesse de nage de routine n'est pas non plus réduite au cours du vieillissement.

Synthèse

Un des résultats clé de ce chapitre de thèse est la variation de la reproduction, étudié au travers du nombre d'œufs produit, concomitante avec les changements de capacité métabolique au cours du cycle de vie. En effet, au cours de la phase juvénile, nous avons observé que l'augmentation de la production d'œufs est associée à l'accroissement de la capacité métabolique, mais aussi à la réduction du taux de croissance des individus : à l'âge métabolique optimal, la production d'œufs est maximale, tandis que le taux de croissance atteint des valeurs voisines de zéro. La phase de déclin de la capacité métabolique, quant à elle, est associée à une réduction de la plupart des activités que nous avons suivie : est observée 1) une baisse de l'efficacité de fertilisation des œufs par les mâles, ainsi que d'une réduction du nombre d'œufs produit par les femelles ; un « trade-off » entre la taille et le nombre d'œufs produits au cours du vieillissement a pu être mis en évidence. 2) La prise alimentaire ainsi que l'énergie investie dans la digestion semblent toutes deux également décliner avec l'âge. Comme cela avait été supposé, la réduction de la capacité métabolique induite par une baisse de la température d'acclimatation est associée à une baisse d'investissement énergétique envers la digestion, ainsi qu'une réduction de la prise alimentaire et de l'effort de reproduction. La dernière activité ayant fait l'objet d'un suivi était la locomotion. Qu'il s'agisse des performances de nages, ou de la locomotion de routine, aucune n'a été affecté par le processus de sénescence ni par la température d'acclimatation chez *Nothobranchius furzeri*.

Etant donné qu'une diminution de la température d'acclimatation a induit un décalage de l'âge métabolique optimal, ainsi qu'un ralentissement du déclin de la capacité métabolique chez *Nothobranchius furzeri*, un effet régulateur de la température sur le déclin

des activités suivi était attendu. Cependant, ceci n'a pu être confirmé par le suivi des variables choisies. Un des objectifs de ce chapitre était de mettre en évidence un lien entre les diversités de longévités entre les individus et des différences de stratégie d'allocation énergétique. Néanmoins, les variables qui ont été mesurées n'ont pas permis d'identifier des stratégies propres aux individus ayant une durée de vie particulière. Ceci pourrait être la conséquence du nombre restreint de poisson ayant pris part à ce suivi, résultant d'un taux de mortalité déjà important lors de la période suivie au cours de la phase sénescence. Le choix des variables qui ont été mesurées (*i.e.* croissance, nombre d'œufs produits, taille des œufs, efficacité des mâles à féconder les œufs, pourcentage du temps alloué aux interactions mâle/femelle) n'a peut-être pas permis de mettre en évidence une stratégie énergétique particulière associée à la longévité.

La variation en courbe gaussienne de l'AS et de la production d'œufs au cours du cycle de vie, ainsi que le déclin de la plupart des activités pendant la sénescence pourraient être liés, entre autre, à des modifications de la performance cardiaque des individus. En effet, le système cardio-vasculaire permet notamment le transport des nutriments et de l'oxygène, indispensable au métabolisme énergétique (Priede, 1977 ; Bennett, 1980 ; Claireaux *et al.*, 2005 ; Farrell, 2007). Ce système a donc une importance considérable sur le métabolisme et la capacité de l'organisme à réaliser ses activités (Wood & McDonald, 1997 ; Farrell, 2002, 2007). Nous avons donc associé ce travail de thèse à une exploration de la modulation des performances de l'activité du système cardio-vasculaire au cours du cycle de vie, ainsi que les répercussions d'une réduction de température sur ce système.

CHAPITRE 5 :

REGULATION DU FONCTIONNEMENT

CARDIAQUE AU COURS DU CYCLE DE VIE

DE *NOTHOBRANCHIUS FURZERI* ACCLIMATÉ

A DEUX TEMPERATURES

Préambule

Le système cardio-vasculaire permet l'approvisionnement des tissus en oxygène et en nutriments, nécessaires aux processus métaboliques. Les performances de ce système vont donc être limitantes de la production d'énergie et ainsi, influencer la capacité des organismes à réaliser leurs activités. Afin de compléter l'étude des variations métaboliques, ainsi que les niveaux d'activités qui y étaient associés, nous avons caractérisé les changements de performances cardiaques au cours de la vie, et si une réduction de la température régulait ses variations. Une analyse de l'expression des gènes *pcna* (marqueur du renouvellement cellulaire), *rcan1* (marqueur de l'hypertrophie des cellules cardiaques) et *cacnb2a* (lié à la synthèse des canaux calciques voltage-dépendants) a accompagné ce travail (collaboration V. Becquet, Projet ALIVE). Ce cinquième chapitre se présente sous la forme d'un article qui sera prochainement soumis au journal « **Experimental Gerontology** ».

Une croissance du cœur est observée au long du cycle de vie de la plupart des vertébrés. Selon le stade de développement de l'organisme, les causes de l'augmentation de la masse cardiaque diffèrent. Au cours du stade juvénile, la croissance de l'organe permet d'accroître sa force de contraction afin que l'organisme puisse répondre à l'augmentation de la demande énergétique due aux besoins grandissants de la croissance gonadique et somatique. En effet, afin d'assurer un apport suffisant en O₂ et en nutriments vers leurs tissus, les individus doivent augmenter leurs performances cardiaques. Concernant le stade sénescence, l'hypertrophie cardiaque a tout d'abord un rôle compensatoire, car elle permet de compenser la diminution du nombre de cardiomyocytes au cours du vieillissement (*i.e.* apoptose). La perte cellulaire s'accompagne également de fibrose, c'est

à dire d'une augmentation de la concentration tissulaire en collagène. Cependant, cette hypertrophie compensée devient malade lorsque elle est trop prononcée. Une fibrose ainsi qu'une apoptose trop importantes conduisent à de la défaillance cardiaque. Par ailleurs, les récepteurs β -adrénergiques diminuent au cours de la sénescence et finissent par atteindre un seuil critique. L'ensemble de ces détériorations conduit à une augmentation des maladies cardio-vasculaires (*e.g.* athérosclérose, hypertension, infarctus du myocarde ; Anversa *et al.*, 1986 ; Lakatta & Levy, 2003) pouvant être responsables de la mort des organismes.

Les différences structurelles du cœur observées au cours de la vie se répercutent sur le processus de couplage excitation-contraction (ECC ; « excitation-contraction coupling » en anglais ; Jiménez-Moreno *et al.*, 2008), permettant la contraction des cardiomyocytes. Ce processus est caractérisé par des flux de calcium au sein des cardiomyocytes. La contraction est déclenchée par l'augmentation de la quantité de calcium intracellulaire. La provenance du calcium est principalement extracellulaire, mais peut aussi impliquer un stock calcique interne, le réticulum sarcoplasmique. La relaxation des cellules cardiaques est, quant à elle, induite par une diminution de la quantité de calcium interne. L'étude du ECC contribue à la caractérisation des performances cardiaques des téléostéens : force, rythme cardiaque, volume d'éjection systolique et débit cardiaque (Aho & Vornanen, 1998 ; Shiels *et al.*, 2002a ; Farrell, 2007). En effet, plus la quantité de calcium mobilisée et les cinétiques des flux de calcium sont élevées, plus le ECC sera rapide et efficace.

Dans ce contexte, nous avons donc étudié les variations morpho-fonctionnelles du cœur au cours de la vie de *Nothobranchius furzeri*, ainsi que le rôle régulateur de la température.

De plus, le travail présenté dans ce chapitre visait à mettre en évidence l'effet de la température, en tant que traitement antiviellissement, sur le cœur de *N. furzeri*.

Les deux hypothèses principales testées dans ce chapitre sont les suivantes :

- Le processus de sénescence s'accompagne d'un déclin des performances cardiaques, qui se caractérise par une hypertrophie du cœur du au phénomène d'hypertrophie des cardiomyocytes, et par une efficacité réduite du ECC provoquant une contraction moins performante des cellules cardiaques.
- La réduction de la température retarde l'hypertrophie du cœur et module les mécanismes impliqués dans la gestion du calcium après stimulation des cellules. Le ralentissement température-dépendant de la sénescence se manifesterait chez les poissons les plus âgés par des performances cardiaques plus efficaces, et en particulier par une meilleure gestion du calcium lors de la stimulation des cellules.

Morpho-functional changes in *Nothobranchius furzeri* cardiomyocytes during aging: temperature impact

Marie Durollet^{1,*}, Vanessa Becquet¹, David Akbar¹, Christel Lefrançois¹,

Nathalie Imbert-Auvray

¹Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS - Université de La Rochelle, La Rochelle, France

*Author for correspondence (marie.durollet@univ-lr.fr)

Keywords: Heart, hypertrophy, calcium handling, Excitation-contraction coupling,
aging, *Nothobranchius furzeri*

Abstract

The cardio-respiratory one is vital for health and longevity of the whole organism by delivering oxygenated blood and metabolic fuel to all tissues in the body. Thus, cardiac performances time-related decline is a variable of interest to better understand aging. Regulation of cardiac pump functions occurring at the cells level, where the force and duration of contraction of the myocytes are determined by the availability of Ca^{2+} . The process whereby an action potential triggers myocyte contraction is called Excitation-contraction coupling (ECC). We investigate age related cardiac plasticity, through heart and cardiomyocytes morphological changes along lifespan, and functioning variation, through ECC characterization in aging *Nothobranchius furzeri* acclimatized at two different temperature. We observed heart and cardiomyocytes hypertrophy in aging, accompanied by modulation in ECC efficiency. Moreover, temperature reduction slows down the age-related morphological and functioning cardiomyocytes deteriorations.

5.1 Introduction

Aging process is a complex phenomenon that results in a progressive decline in life functions ended by death (Harman, 1981 ; Kirkwood & Austad, 2000). Among these life functions, the cardio-respiratory one is vital for health and longevity by delivering oxygenated blood and metabolic fuel to all tissues in the body (Farrell, 2002; Claireaux *et al.*, 2005). In parallel, it has already been demonstrated that the entrance in the senescent phase leads to heart increased diseases, such as atherosclerosis, hypertension, myocardial infarction, and stroke (Anversa *et al.*, 1986a ; Olivetti *et al.*, 1991 ; Gates *et al.*, 2003 ; Lakatta & Levy, 2003b ; Suh *et al.*, 2003 ; Hacker *et al.*, 2006). Consequently, considering the vital role of cardio-respiratory function as well as the age-related complications linked with this life function, cardiac performances is a variable of interest to better understand the issue of aging. Although cardiac diseases have already been noted, the physiological mechanisms underlying these complications during aging are not fully understood.

Regulation of cardiac pump functions occurs at the cell level, where the force and duration of contraction of the myocytes are determined by the availability of Ca^{2+} (Coyne *et al.*, 2000). The process whereby an action potential triggers myocyte contraction is called Excitation-contraction coupling (ECC). In vertebrate, when a myocyte is depolarized by an action potential, the contractile Ca^{2+} is derived from two sources: 1) external Ca^{2+} influx through the sarcolemma: via both Ca^{2+} channels L-type Ca^{2+} current (*i.e.* $\text{I}_{\text{Ca,L}}$) and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (*i.e.* Na/Ca ; Bers *et al.*, 1989, 1993 ; Nuss & Houser, 1992 ; Tibbits *et al.*, 1992 ; Hüser *et al.*, 1996 ; Bers, 2000 ; Ollivier *et al.*, 2015), and 2) internal Ca^{2+} mobilization from stores in the sarcoplasmic reticulum (Fabiato, 1983 ; Shiels *et al.*, 1999 ; Bers, 2000 ; Coyne *et al.*, 2000 ; Imbert-Auvray *et al.*, 2013). The

relative importance of these two sources differs among vertebrate groups (Tibbits *et al.*, 1991). In fish cardiomyocytes, Ca^{2+} influx through ICa_L accounts for the major part of the Ca^{2+} that activates contraction (Morad *et al.*, 1981 ; Fischmeister & Horackova, 1983 ; Tibbits *et al.*, 1991 ; Thomas *et al.*, 1996 ; Vornanen, 1997 ; Aho & Vornanen, 1998 ; Coyne *et al.*, 2000).

Considering the cardiac performances decline as a key variable of interest to follow aging and the lack of investigation conducted at the cellular levels, we propose to conduct, in *Nothobranchius furzeri*, myocytes morphology analysis and to investigate age-related cardiac functioning variation through ECC characterization. These two approaches were complemented with functional genomic approach. Indeed, the expression of three genes, *rca* (cardiomyocyte hypertrophy marker), *pcna* (cellular renewal marker) and *cacnb2a* (involved in the synthesis of voltage-dependant calcium channel) were quantified.

More specifically, we address the following questions: 1) Is there age-related morphological modifications of heart and cardiomyocytes? 2) Is there age-related alteration of Excitation-contraction coupling. In parallel, we investigated the effect of an anti-aging treatment (*i.e.* temperature reduction). Indeed temperature has been shown to regulate *Nothobranchius furzeri* lifespan (Valenzano *et al.*, 2006a) and more precisely age-related cardiac complications has been observed to be modulated by temperature in Ren *et al.* (2009, 2011). For this purpose we evaluated these parameters in *N. Furzeri* at three several ages (from 7 to 36 weeks). Fish were acclimatized to their optimal temperature of 26 °C, and to a sub-optimal temperature of 22°C.

N. furzeri has been chosen as a model species in this study since it is the shortest-lived vertebrate that can be reared in captivity with a lifespan of about 6 months (Terzibasi *et*

al., 2008). Consequently, many typical degenerations linked to vertebrate aging can be observed in a short period of time (Di Cicco *et al.*, 2011).

5.2 Materials and Methods

5.2.1 Fish

Nothobranchius furzeri of the strain MZM 0410 (Terzibasi *et al.*, 2008) were bred in LIENSs laboratory (Coast Environment & societies laboratory, La Rochelle, France), where the entire life cycle of this species is controlled. From hatching to 10 days post hatching (dph), (a) juveniles were fed twice a day with newly hatched *nauplii* of *Artemia salina*, (b) about half of 24 °C-water was daily renewed and (c) conductivity was progressively increased from ~200 $\mu\text{S/m}$ to ~1300 $\mu\text{S/m}$. At 10 dph, groups of 25 individuals were formed and transferred in rearing tanks (L x l x h: 0.50 x 0.30 x 0.25 m) where they are acclimatized at 2 different temperatures: 25.6 ± 0.5 °C, considered as the optimal temperature for this species (Genade *et al.*, 2005), and a sub-optimal temperature of 22.1 ± 0.8 °C, which is the lowest temperature allowing reasonable growth and reproduction (Durollet, personal observations). While in rearing tanks, fish were held in pure deionized water with artificial sea salt (1300 $\mu\text{S/m}$), fed twice a day *ad libitum* with *Chironomus larvae* and exposed to artificial light period of 12 hours per day.

5.2.2 Experimental protocol: Calcium handling study

Three ages per temperature were tested along the *Nothobranchius furzeri* life cycle: 7 weeks-old for the juvenile stage (26°C: $N_{\text{cells}} = 11$, $N_{\text{fish}} = 16$; 22°C: $N_{\text{cells}} = 19$, $N_{\text{fish}} = 20$, sex-ratio \approx 1:1); 18 weeks-old for the adult stage (26°C: $N_{\text{cells}} = 16$, $N_{\text{fish}} = 6$; 22°C: $N_{\text{cells}} =$

25, $N_{\text{fish}} = 8$, sex-ratio $\approx 1:1$), and 36 weeks-old for the senescent stage (26°C: $N_{\text{cells}} = 12$, $N_{\text{fish}} = 6$; 22°C: $N_{\text{cells}} = 13$, $N_{\text{fish}} = 4$, sex-ratio $\approx 1:1$). N_{cells} represents the number of cardiomyocytes that was tested, and N_{fish} indicates the fish number where tested-cardiac cells had originated.

5.2.2.a Solutions

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (France).

The isolation Ca^{2+} -free solution in mM: NaCl, 100; KCl, 10; KH_2PO_4 , 1; MgSO_4 , 5.4; taurine, 50; α D-glucose, 20; HEPES, 10; EGTA, 0.1 (adjusted to pH 7.1 using KOH, osmolality: 300 mOsmol L^{-1}).

The enzymatic digestion solution comprised collagenase (Type IA, 0.6 mgmL^{-1}), trypsin (Type III, 0.35 mgmL^{-1}) and BSA (0.75 mgmL^{-1}), added to the isolation Ca^{2+} -free solution.

The incubation medium Ca^{2+} solution in mM: glucose, 10; NaCl, 130; KCl, 5; MgSO_4 , 3; NaH_2PO_4 , 0.5; CaCl_2 , 2; HEPES, 10 (adjusted to pH 7.35 using KOH).

The hyperpotassic 100mMK⁺ solution (100K) in mM: glucose, 1; NaCl, 35; KCl, 100; MgSO_4 , 1.5; NaH_2PO_4 , 0.4; CaCl_2 , 8; HEPES, 10 (adjusted to pH 7.3 using KOH).

Phosphate-buffered saline (PBS solution) in mM: NaCl, 137; KCL, 2.7; NaHPO_4 , 10; KH_2PO_4 , 1.76

5.2.2.b Ventricular cardiomyocytes isolation

All experiments were performed at room temperature (20 °C). *Nothobranchius furzeri* were anaesthetized with 0.008% eugenol and hearts were rapidly excised. Ventricles of three (*i.e.* for juvenile heart sampling) or two (*i.e.* for adults or senescent heart sampling) fish were pooled together. Single ventricular cells were obtained by enzymatic dissociation, using a protocol derived from that described in other studies (*c.f.* Chapter 2.3.1.; Chatelier *et al.*, 2006; Vagner *et al.*, 2014; Vornanen, 1997). Ventricle was cut into small pieces with scissors and immersed in 2 ml of Ca²⁺-free solution with enzymes. They were gently agitated by means of a mechanical stirrer during 10min at 20°C. Subsequently, ventricle parts were submitted to the following enzymatic treatment: (1) the ventricle was transferred in a Petri dish containing 2 mL of the enzymatic digestion solution, then (2) mechanically agitated for 3 min through the opening of a Pasteur pipette; (3) the small pieces of ventricle not yet dissociated were removed and placed in a new Petri dish containing 2 ml of enzymatic digestion solution, while the supernatant was centrifuged (5 min, 4000 rpm, 4 °C); and (4) the pellet was gently suspended in 500 µL of the isolation Ca²⁺-free solution. Steps 1 to 4 were repeated until all the ventricle pieces were dissociated. Isolated cardiomyocytes in 500 µL of the isolation Ca²⁺-free solution were then transferred in a new dish equipped with a glass bottom, allowing their fixation. In order to fix the cardiac cells, they were progressively dropwise immersed in an incubation medium Ca²⁺ solution containing 4 µM of blebbistatin (Sigma) dissolved in Dimethyl sulfoxide (*i.e.* DMSO; in order to avoid cell contracture), and maintained in a dark room at 20°C for at least 6 h.

5.2.2.c Measure of Ca^{2+} flux

Ca^{2+} fluxes were measured using the permeant form of the fluorescent dye FLUO-4 (FLUO-4 AM acetoxy-methyl-ester, Invitrogen, Saint-Aubin, France), dissolved in DMSO. The probe was added (4 μL) to the incubation medium Ca^{2+} solution in the dish in which cells were fixed. After 1h of loading in a dark room, cells were carefully washed with the incubation medium Ca^{2+} solution, and stored at least for 20 min. Then fluorescence was recorded using a microscope LEICA DMI6000B (Saint-Jorioz, France) equipped with a FLUO Oligochrome lamp and a camera ORCA-R2. The acquisition software was MorphoStrider (Explora-Nova, La Rochelle, France). Excitation of FLUO-4 was set at 494nm, and the fluorescence emission was collected through a dichroic filter at 505nm.

In order to characterize ECC, one part of isolated myocytes was stimulated with 100K solution, inducing total calcium stock release (from the extra-cell and possibly from the RS) at an ambient temperature of 20 °C. The other cardiomyocytes part was stimulated with caffeine solution still at 20 °C. This solution only allows the release of the calcium storage in the SR. A maximum of 6 cells per dish were stimulated.

Regarding the change the potassium equilibrium potential inducing by 100K stimulation, it results in a decrease of the inward rectifier potassium current which is known to stabilise the resting membrane potential (Galli *et al.* 2009). Thus, cardiomyocytes exposed to 100K solution were depolarised, inducing global Ca^{2+} fluxes, possibly via the activation of L-type Ca^{2+} channels and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers. Cells were locally perfused with incubation medium Ca^{2+} solution thanks to a catheter ($\varnothing = 1 \text{ mm}$) positioned near the cell (*i.e.* less than 1 mm). After 30 s, this solution was exchanged for one drop of 100K

solution. Then, stimulation of the cardiomyocytes was stopped, and instantaneously replace by perfusion of the incubation medium Ca^{2+} solution.

For each stimulated cell, the fluorescence was normalised (F/F_0), where F_0 was the mean of the data points recorded during the first 30s in which cells were perfused with the incubation medium Ca^{2+} solution. Then, for each cell, the maximal amplitude of calcium mobilised, the kinetics of calcium entrance and the kinetics of 50 % calcium release were measured (Imbert-Auvray *et al.*, 2013).

5.2.2.d Myocytes morphology analysis

After 6 h of loading in the dark room, the isolated myocytes cell membrane was visualized by staining with the lipophilic dye di-8-ANNEPS ($2\mu\text{M}$ for 15min, Invitrogen, Saint-Aubin, France), and fluorescent microscopy (LEICA, DMI6000B), as previously described.

Isolated cells placed on slide from 1.5 h were fixed with 4% paraformaldehyde with PBS for 40 min, then rinsed two times with PBS solution. Subsequently, they were permeabilized with 0.1% Triton for 10 min. For immunofluorescence, fixed cells were incubated for 40 min with phalloidin-FITc (Fluorescein isothiocyanate labelled, $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ Sigma) and 5 min with DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, 285 nM, Sigma), both diluted with PBS. Samples were examined, and pictures were acquired on a fluorescent microscope, equipped with MorphoStrider software, as previously described. Width measures were taken in at a midpoint of the z-scan. Myocyte depth was calculated from the z-stack images of myocytes. Volume of each myocytes was given by MorphoStrider software.

5.2.3 Experimental protocol: functional genomic approach

At 7, 18, and 36 weeks, heart from males fishes of each temperature were extracted and flash frozen in liquid nitrogen before conservation at -80°C . Total RNA was extracted from 5 to 10 individuals with the Nucleospin®RNA extraction kit according to protocol (Macherey Nagel). Quantity and quality of each RNA were checked by nanodrop and by electrophoresis gel (1.5% agarose in TAE 0.5%). Only RNA with a ratio A260/280 > 1.8 were conserved for further analysis. Each RNA was treated with 3U of DNase I (Sigma-aldrich®) to exclude genomic DNA. Two μl of total RNA were then reverse transcribed according to the Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific™ protocol. Two controls were added to this step, a NoRT control (without reverse transcriptase to check the absence of genomic DNA) and a NTC (No Template Control). Diluted cDNA (1/4) were used in RT-qPCR. Primers for the *stox2*, *pcna*, *rcan1* and *cacnb2a* genes were designed from sequences obtained from the *Nothobranchius furzeri* transcriptome browser (<https://gen100.imb-jena.de/EST2UNI/nfintb/>; seqamorces, supplementary material). *stox2* was used as a housekeeping gene according to Hartman et al (2009). According to MIQE Guidelines (Bustin et al, 2009) efficiency of each gene was checked and a dissociation curve was obtained for each reaction to assess the amplification of only one product. Real time PCR was performed on a Mx3005P qPCR System (Agilent Technologies) in a total volume of 10 μl with 5 μl of 2X Brilliant III Ultra-fast SYBR® green QPCR Master Mix (Agilent Technologies). All reactions were performed in triplicate with a negative control. The reaction protocol consisted in 30 sec at 95°C , 40 cycles of 10 sec at 95°C and 5 sec at 56°C (*cacnb2a*), 58°C (*pcna* and *rcan1*) or 60°C (*stox2*).

5.2.4 Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using Statistica software. The normality (using the Kolmogorov-Smirnoff test) and homoscedaticity (using the Barlett test) of data were found to be respected. Therefore, for each measured variable, two-way ANOVA was used to determine significant differences due to age and temperature ($p < 0.05$). When significant differences were emphasized by two-way ANOVA, data were submitted to a post-hoc test of Fisher ($p\text{-value} < 0.05$)

To compare gene expression at different ages for one temperature or at the same age between the two temperatures, we used the $\Delta\Delta C_t$ method (Pfaffl et al. 2002). This method allow the comparison of two conditions (a reference and a control) after normalization of C_t value by a housekeeping gene (stable expression in all conditions) and is based on a pairwise fixed reallocation randomisation test© (10 000 permutations).

5.3 Results

5.3.1 Morphological modifications

5.3.1.a Cardiomyocytes ultrastructure

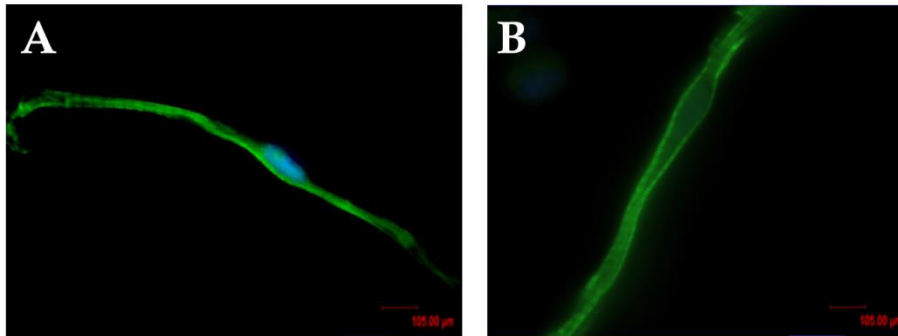


Figure V. 1 Images of cardiomyocytes stained with **A)** DAPI-phalloidin, and **B)** ANEPPS. DAPI staining shows cell nuclei (blue); phalloidin shows the presence of actin (green). ANEPPS is a voltage-sensitive dye who only marks cells membranes. Cells were isolated in 7 weeks-old *Nothobranchius furzeri* acclimatized at 26 °C.

DAPI-phalloidin stain revealed that whatever *Nothobranchius furzeri* age and temperature, cardiomyocytes are mononucleate, with an elongated shape (Figure V.1 A). Staining with ANEPPS highlighted that whatever the age and the temperature of acclimatization, sarcolemma had very few intussusception (Figure V.1 B)

5.3.1.b Biometry of the heart

Table V. 1 Heart mass/fish mass ratio ($\mu\text{g/g}$; mean \pm SE), cardiomyocytes volumes (μm^3 ; mean \pm SE) length (μm ; mean \pm SE) and wide (μm ; mean \pm SE) of *Nothobranchius furzeri* as a function of age, at the two experimental temperatures. For each variable and at each temperature, letters symbolize significant differences showed by a post-hoc test of Fisher (p-value < 0.05). Significant differences between 22 and 26 °C for each tested-age are symbolized by an asterisk.

		7 weeks	18 weeks	36 weeks
Heart mass/fish mass ratio ($\mu\text{g/g}$)	22 °C	2.81 \pm 0.17 a	1.50 \pm 0.15 b	2.18 \pm 0.75 b
	26 °C	1.27 \pm 0.10 a	3.65 \pm 0.15 bc	4.31 \pm 1.10 ac
Cardiomyocytes Volumes (μm^3)	22 °C	2312 \pm 85 a	2304 \pm 14 a	2498 \pm 21 a
	26 °C	2025 \pm 12 a	2298 \pm 83 bc	2475 \pm 86 ac
Cardiomyocytes Length (μm)	22 °C	109 \pm 8 a	111 \pm 13 a	102 \pm 11 a
	26 °C	114 \pm 10 a	105 \pm 6 a	107 \pm 9 a
Cardiomyocytes Wide (μm)	22 °C	4.91 \pm 0.22 a	4.87 \pm 0.43 a	4.99 \pm 0.45 a
	26 °C	4.68 \pm 0.37 a	4.86 \pm 0.34 a	5.2 \pm 0.25 a

Heart mass/fish mass ratio was significantly impacted by age (p-value = 0.758×10^{-2} ; Table V. 1). At 26 °C, significant increase between the three tested ages was revealed (p-value = 0.266×10^{-3} for 7 vs 18 weeks; p-value = 0.179×10^{-4} for 18 vs 36 weeks). At the sub-optimal temperature, a significant decrease of the ratio heart mass/fish mass was emphasized from 7 to 18 weeks-old (p-value = 0.857×10^{-2}), while no significant difference was observed from 18 to 36 weeks old. Temperature had a significant impact on the ratio heart mass/fish mass and interacted on the variation of this ratio in aging *Nothobranchius furzeri* (p-value = 0.433×10^{-2} ; age*temperature: p-value = 0.987×10^{-3}). Indeed, in 7 weeks-old fish, heart mass/fish mass ratio was more important at 22 °C, while in 18 and 36 weeks-old fish, this ratio was higher at 26 °C (p-value = 0.21×10^{-1} at 7 weeks, p-value = 0.34×10^{-2} at 18 weeks, p-value = 0.87×10^{-2} at 36 weeks).

The age of the fish had a significant impact on cardiomyocytes volume too (p-value = 0.152×10^{-8} ; Table V. 1). At the optimal temperature (26 °C), cardiomyocytes volumes increased with age (p-value = 0.687×10^{-2} for 7 vs 18 weeks; p-value = 0.125×10^{-2} for 18 vs 36 weeks), while at the sub-optimal temperature (22°C), no significant difference was highlighted according to the age of the fish. Then, cardiomyocytes volume changed according to the temperature of acclimatization, and this factor interacted with the effect of fish ages on cardiac cells (temperature: p-value = 0.355×10^{-1} ; age*temperature: p-value = 0.320×10^{-5}). Indeed, at 7 weeks-old, myocytes had a larger volume at 22 °C compared to the 26 °C-acclimated fish (p-value = 0.314×10^{-1}), while no difference in volume was observed between fish of 18 weeks-old acclimatized at 22 and those acclimatized at 26 °C. In older fish (36 weeks), volume became more important at the warmer temperature (p-value = 0.188×10^{-1}).

Cardiomyocytes length and wide, for their part, did not significantly vary with age.

5.3.2 Genomic approach

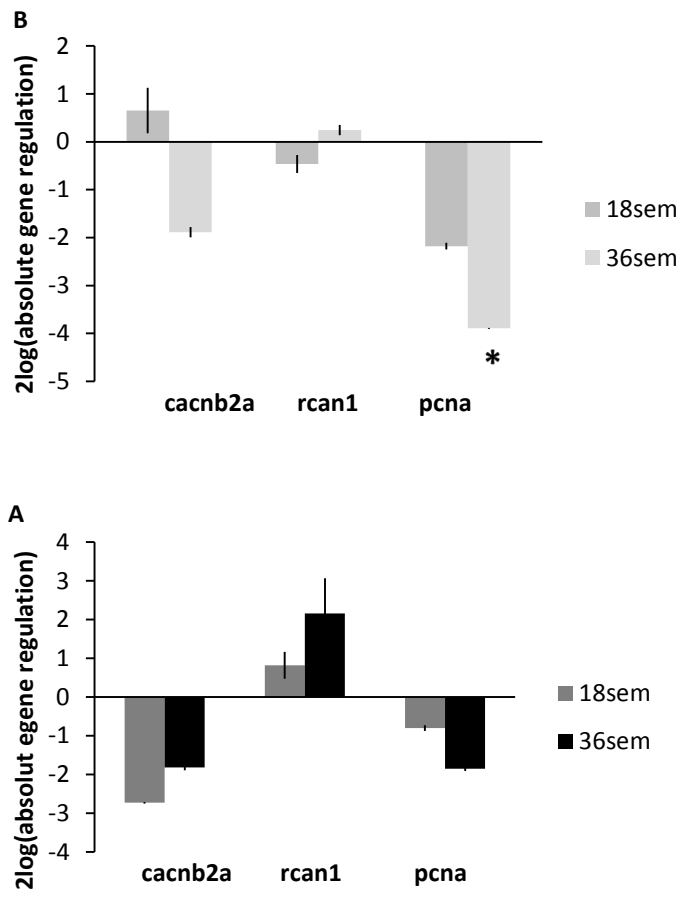


Figure V. 2A) Relative gene expression in *Nothobranchius furzeri* acclimatized at 26°C and B) Relative gene expression in *Nothobranchius furzeri* acclimatized at 22°C; 18 and 36 weeks-old fish are compared to control fish of 7 weeks-old.

Whatever the tested gene (*cacnb2*, *rcan1* and *pcna*), no significant modulation of expression was observed at 26°C due to age (Figure V. 2A). However for 18 and 36 weeks a non-significant down-regulation of *cacnb2a* was observed ($R = -2.732$ and -1.817 , respectively). For *rcan1* and *pcna* genes, a modulation of expression was observed only at 36 weeks (up-regulation for *rcan1*, $R = 2.161$ and down-regulation for *pcna*, $R = -1.857$). At 22°C, no modulation of *rcan1* expression was observed ($R = -0.465$ and 0.245 for 18 and 36 weeks respectively; Figure V. 2B). A non-significant down-regulation of *cacnb2a*

was observed from 18 to 36 weeks ($R = -1.885$, $p\text{-value} = 0.652$). *pcna* gene was down-regulated from 7 to 18 weeks with a nearly significant value ($R = -2.18$, $p\text{-value} = 0.053$) and a significant value from 18 to 36 weeks ($R = -3.894$, $p\text{-value} = 0.012$).

5.3.3 Functional modifications for ECC

5.3.3.a ECC characterization: Calcium handling after depolarization for cardiomyocytes contraction

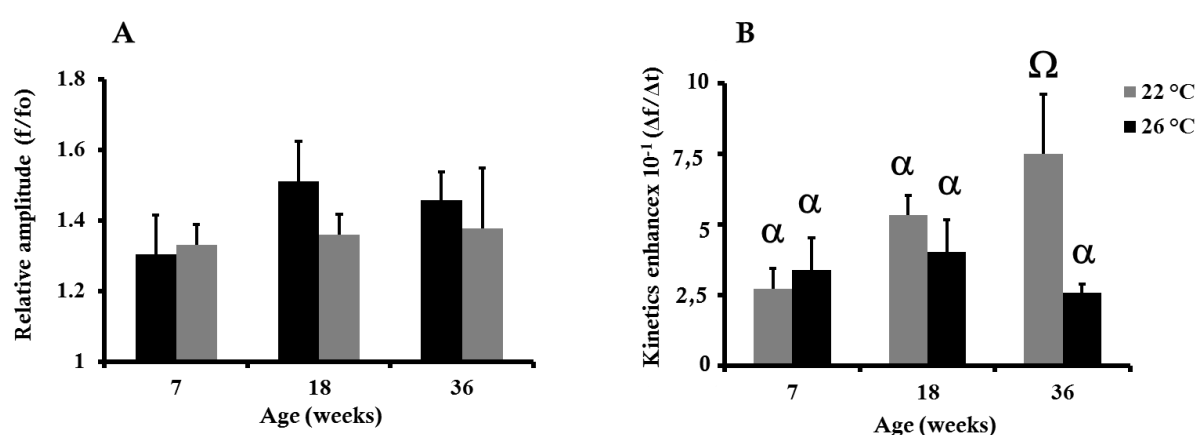


Figure V. 3 (A) Relative amplitude (mean, \pm SE), and (B) Kinetics enhance (mean, \pm SE) characterizing the cardiomyocytes calcium flux allowing cells contraction in aging *Nothobranchius furzeri* exposed at two different temperature, 22 °C and 26 °C. No significant effect of age nor temperature was observed on the relative amplitude. Symbols indicate the significant differences between each tested conditions and # represents the combined effect of age and temperature, resulting from two-way ANOVA ($p\text{-value} < 0.05$).

Regarding the relative amplitude of the calcium transient involved in cardiomyocytes contraction no significant effect of age nor temperature was observed.

Concerning the kinetics of the calcium entrance into the cell, it differed according to the age of the fish ($p\text{-value} = 0.484 \times 10^{-1}$): a significant increase was observed for 36 weeks fish acclimated at sub-optimal temperature ($p\text{-value} = 0.117 \times 10^{-1}$). This increase at 36 weeks was not observed at the optimal temperature. Then, the kinetics of the calcium

entrancechanged according to the temperature of acclimatization (p-value = 0.724×10^{-2}):it was not significantly different at 7 and 18 weeks with the temperature of acclimatization, but significantly higher at 22 °C than at 26 °C in 36 weeks old fish (p-value = 0.187×10^{-2}).

5.3.3.b ECC characterization: Calcium handling after depolarization for cardiomyocytes relaxation

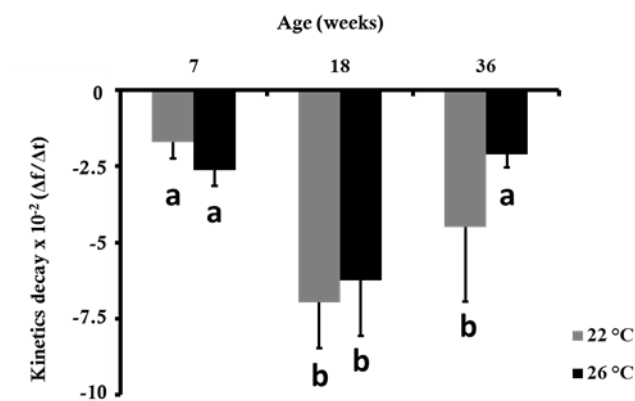


Figure V. 4 Kinetics decay (mean, \pm SE) characterizing the cardiomyocytes calcium flux allowing cells relaxation in aging *Nothobranchius furzeri* exposed at two different temperatures, 22 °C and 26 °C. Letters symbolize the significant differences between each tested conditions and # represent the combined effect of age and temperature, resulting from two-way ANOVA (p-value < 0.05).

The kinetics decay inducing calcium extrusion was significantly impacted by age (p-value = 0.216×10^{-1} ; Figure V. 4).At 26 °C, a significant increase was observed from 7 to 18 weeks-old (p-value = 0.502×10^{-2}), and then followed by a significant decrease from 18 to 36 weeks-old (p-value = 0.644×10^{-2}). At 22 °C, an increase was observed from the juvenile to the adult stage(p-value = 0.102×10^{-1}), while no significant variation of this parameter was emphasized from the adult to the senescent stage. Consequently, a significant difference induced by temperature was observed for 36 weeks old fish (p-value = 0.412×10^{-1}): The kinetics decay was higher for fish acclimated to 22°C than for fish

acclimated to 26°C (p-value = 0.498×10^{-1}). No significant combined effect of age and temperature was observed on this parameter.

5.4 Discussion

The aim of the present study was to emphasize the effects of age on cardiac morpho-functioning in *Nothobranchius furzeri*, through cardiomyocytes structural and functional modifications. In parallel, we investigated the effect of temperature reduction on the age-dependant cardiac morphological and functional changes.

5.4.1 Morphological modification

Regarding the relative heart mass (heart mass/fish mass ratio), it increased along the life cycle of *Nothobranchius furzeri* acclimatized at its optimal temperature (*i.e.* 26 °C; Table V. 1). This phenomenon was associated with the increase in cardiomyocytes volumes between the three tested-ages (Table V. 1), as it was observed in many other vertebrates (Anversa *et al.*, 1986a ; Olivetti *et al.*, 1991 ; Lakatta & Levy, 2003 ; Torella *et al.*, 2004 ; Kaushik & Engler, 2014 ; Gonzalez & Barrios, 2015 ; Khrapko *et al.*, 2015 ; Sujkowski & Wessells, 2015). Heart growth could be divided in two different phases along *N. furzeri* life cycle. First, from the juvenile to the adult tested-ages, fish cardiac growth could be the result of an increase in energetic demands, characteristic of this stage of life. Other authors observed in several vertebrates species similar phenomenon of heart mass increase from the juvenile to the adult stages (Rudolph, 1979 ; Anversa *et al.*, 1983 ; Rakusan, 1984). In this case, the growth of this organ was associated with the increasing circulatory in response to the highest energetic demands for somatic and gonadic growths. Such an increase in heart mass permits to improve systolic efficiency and

consequently enhance oxygenated blood delivery into all the organism (Frey & Olson, 2003). This result is consistent with the increase in metabolic capacities that was observed by Durollet *et al.* (2015, *submitted*, Chapter 3) from the juvenile to the adult stage in *Nothobranchius furzeri*. Secondly, from the adult to the senescent stage, heart enlargement may allow to compensate for the direct effects of age-dependant decline in cardiac contractility (Lakatta & Levy, 2003b ; Kuba *et al.*, 2007 ; Wittköpper *et al.*, 2010) and the possible increase in blood viscosity (Carallo *et al.*, 2010). It should have be noted that, when hypertrophy becomes too important, it has deleterious effect, leading to an increase of cardiac diseases, such as atherosclerosis, hypertension, myocardial infarction, and stroke (Anversa *et al.*, 1986a ; Olivetti *et al.*, 1991 ; Gates *et al.*, 2003 ; Lakatta & Levy, 2003b ; Suh *et al.*, 2003 ; Hacker *et al.*, 2006). Consequently, it would have been of interest to relate the morphological changes observed in our study to some cardiac complications observable at the individual level.

Temperature reduction leaded to a higher relative heart mass in juveniles, which may reflect an 'adaptative' hypertrophy induced by cold-acclimatization (Perasalmi1997). This was accompanied by higher cardiomyocytes volumes at the sub-optimal temperature. Then, adult and senescent individuals acclimatized at the optimal temperature did not show cardiac hypertrophy, neither increase in cardiomyocytes volumes, while aging. This may indicate a regulatory role of temperature reduction in aging, reflected by a slow-down of the heart hypertrophy phenomenon induced by senescence.

Regarding the *rcan1* gene expression (reflecting cardiomyocytes hypertrophy) in aging, although not significant, trends can be identified. At the optimal temperature, *rcan1* gene

seemed to follow an age-dependant sur-expression. Such a sur-expression could be responsible of the hypertrophy development observable through the heart and cardiomyocytes enlargement in senescent fish.

The sur-expression of *pcna* gene in 7 weeks-old fish, compare to 18 and 36-weeks old fish, translates the cell renewal. It may indicate that cardiac growth could be mainly induced by cardiomyocytes hyperplasia, a phenomenon that was commonly observed from the juvenile to the adult stages in other vertebrate species (Epstein et al., 1999 ; Frey & Olson, 2003 ; Carreño et al., 2006). This may corroborate with the heart enlargement from 7 to 18 weeks-old which was not associated with an increase of cardiomyocyte volumes. It is thus possible that cardiac growth from the juvenile to the adult stage is due to cardiomyocyte hyperplasia. From the adult to the senescent stages, an under-expression of the *pcna* gene in heart indicates that there is an age-dependant decrease in cardiomyocytes hyperplasia. This was associated with a tendency of sur-expression of the *rcan1* gene from 18 to 36 weeks, which could confirm that heart hypertrophy in senescent fish may be mainly due to cardiomyocytes hypertrophy.

In fish acclimatized at the sub-optimal temperature, no difference in *rcan1* expression was observed along the life cycle. It may corroborate with the fact that cardiac hypertrophy from the senescent to the adult stages was not observed in 22 °C-acclimated fish. Regarding *pcna* expression, even though no significant difference was noticed, trends can be identified. It seems that *pcna* was under-expressed along 22 °C-acclimated *Nothobranchius furzeri* life cycle. This may indicate that cardiomyocytes hyperplasia phenomenon decrease between the three tested ages (*i.e.* 7, 18 and 36 weeks). This result

is consistent with the decreasing heart mass that was observed from 7 to 18 weeks in fish acclimatized at the sub-optimal temperature.

5.4.2 Functional modification

In our study, the calcium transient rises and falls were respectively index of mechanisms responsible of calcium rise inducing contraction and calcium extrusion responsible for relaxation. At the optimal temperature, the quantity of calcium mobilized during contraction, and the kinetics of calcium transient into the cell did not vary significantly (Figure V. 3 A & B) with age. The kinetic of the calcium extrusion allowing cardiomyocytes relaxation, for its part, was different according to fish-ages. Calcium extrusion was lower in cardiomyocytes of juveniles compare to cells of 18 weeks-old fish (Figure V. 4). Then, from 18 to 36 weeks-old, the kinetics of calcium extrusion decreased, which significate that calcium extrusion was less efficient at 36 weeks-old compare to 18 weeks-old. Heart and cardiomyocytes hypertrophy that we observed in the senescent stage could be responsible of the longer calcium handling. Indeed, action potential prolongation is common finding in animal models of cardiac hypertrophy (Kleiman & Houser, 1988; Wickenden *et al.* 1998). Difference in action potential profiles have been found to be associated with variation in the balance between the number of activate L-type calcium channels and sodium/calcium exchangers: sodium/calcium exchangers possibly up-regulate in the hypertrophied heart (Yamazaki *et al.*, 1993), while L-type calcium channels is either unchanged (Beuckelmann *et al.*, 1992; Meszaros *et al.*, 1997) or down-regulate (Nuss & Houser, 1991; Ming *et al.*, 1994).

Fish acclimatized at the sub-optimal temperature (22 °C) showed variations in the excitation-contraction coupling (ECC). While calcium amplitude involved in ECC did

not change along the life cycle of *Nothobranchius furzeri* acclimatized at 22 °C, kinetics of calcium entrance increased from the adult to the senescent stage. This could suggest that at 22 °C, for 36 weeks-old fish, the coupling between excitation and contraction is faster and thus the systolic efficiency could be higher. Regarding the kinetics of extrusion, they increased from 7 to 18-weeks old, afterwards remained stable at 36 weeks-old. It may indicate that ECC of cardiomyocytes of adult fish is as efficient as ECC of cardiomyocytes in senescent fish.

Temperature reduction modified the age dependant changes in ECC. An increase in kinetics of Ca^{2+} entrance was observed from the adult to the senescent stage, while this parameter did not change at the optimal temperature. Then, temperature reduction leaded to difference in the pattern of kinetics of Ca^{2+} extrusion in aging individual: an increase was noticed from 7 to 18 weeks-old at both temperatures, afterwards a decrease was only observed in the 26 °C-acclimated fish from 18 to 36 weeks-old, while no variation of this parameter characterized the entrance in the senescent stage for the 22 °C-acclimated fish (Figure V. 4). The temperature-dependant variation in kinetics of calcium handling could be, among other, due to the slow-down in the age-dependant hypertrophy of the heart. Because cardiac hypertrophy was not highlighted in 22 °C-acclimated fish, action potential may not be prolonged in senescent fish, allowing to keep unchanged kinetics of calcium handling from the adult to the senescent stage.

Regarding *cacnb2a* gene expression (involved in the synthesis of voltage-dependant calcium channel), our results showed a tendency for down-regulation of the β -subunit of L-type calcium channel from 7 to 18 weeks, following by *cacnb2a* gene expression which seemed to slightly increase from 18 to 36 weeks at 26 °C. At 22 °C, a non-significant

decrease in *cacnb2a* expression was observed from 18 to 36 weeks-old. All these results about *cacnb2a* expression are not consistent with the kinetics of calcium handling that we observed in cardiomyocytes, whatever fish age and temperature of acclimatization. The discrepancy between kinetics of calcium entrance and *cacnb2a* expression may have several explanations like post-transcriptional regulation of this channel or modulation of other genes coding for the other subunits in particular those which code for the pore-forming subunit (α -subunit, *cav1.2*). Electrophysiological study of the L-type calcium channel could give new insights.

This study emphasizes a senescence-dependant decline in cardiac morpho-functionality through heart and cardiomyocytes enlargement associated with a slow-down in ECC process. In senescent fish, cardiac hypertrophy may induce action potential prolonged that decreases the kinetics of calcium handling. Furthermore, temperature reduction, in addition to extending lifespan, could lead to possible delay in age-dependant cardiac deterioration. Indeed, at the sub-optimal temperature, we did not observe heart hypertrophy and decline in ECC process during senescence. However such conclusions should be cautious since they need to be confirmed by further studies focusing on all mechanism that play a role on cardiac performances, such as measures of the force of contraction and the pumping capacity of the heart. Furthermore, it could be interesting to complete the present study with heart histopathology study to observe morphological alterations likely to impair functional integrity at the organ level.

All the results regarding morpho-functional changes in *Nothobranchius furzeri* heart in aging indicate that, when fish are acclimatized at their optimal temperature, the cardiac hypertrophy in senescent individual is associated with decline in the cardiomyocytes ECC process.

Synthèse

L'objectif de ce chapitre était d'étudier 1) les changements de morphologies du cœur et des cellules cardiaques et 2) la plasticité des mécanismes impliqués dans la contraction des cardiomyocytes qui se mettent en place au cours du vieillissement et en fonction de la température d'acclimatation de *Nothobranchius furzeri*.

Au cours du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri*, la taille du cœur augmente (Table V. 1.). Ces différences morphologiques au niveau de l'organe sont la conséquence 1) d'une hyperplasie des cardiomyocytes entre le stade juvénile et le stade adulte ; puis 2) éventuellement d'une hypertrophie des cellules cardiaques au cours de la sénescence. L'hypertrophie cardiaque a préalablement été constatée chez *N. furzeri* par Di Cicco et al. (2011) lors d'autopsies post-mortem. La réduction de la température d'acclimatation semble retarder l'apparition de l'hypertrophie du cœur et des cardiomyocytes des individus sénescents, traduisant un ralentissement possible de la sénescence du cœur.

Une variation de la fonctionnalité des cardiomyocytes en fonction de l'âge a également été mise en évidence dans ce chapitre. L'analyse des transitions de calcium entre les 3 âges testés montre que la quantité de calcium mobilisée pour la contraction-relaxation des cellules cardiaques ne diffère pas selon l'âge des individus. Cependant, les cinétiques des flux de calcium se réduisent du stade adulte au sénescence. Les vitesses caractérisant respectivement l'augmentation de calcium puis son expulsion seraient plus lentes chez les organismes sénescents. Il semble donc que l'ECC soit moins efficace chez les individus les plus âgés. Ces modifications sont probablement liées à l'hypertrophie cardiaque qui se

met en place au cours de la sénescence. Elles pourraient aussi refléter une diminution de l'énergie disponible consacrée à l'homéostasie du calcium dans la cellule ; ceci est particulièrement vrai pour l'expulsion du calcium.

A 22° C, cette tendance n'est pas observée, les cinétiques des flux de calcium ne présentent pas de réduction du stade adulte au stade sénescence. Cette différence entre les deux températures suggère que les mécanismes de re-pompage de calcium sont plus performants à 36 semaines à 22 °C qu'au même âge à 26 °C. Il est donc probable qu'à 26 °C, ces mécanismes subissent plus fortement les effets délétères de la sénescence.

Nous avons donc mis en évidence dans ce chapitre un déclin des performances cardiaques dû au processus de sénescence. La détérioration âge-dépendante du cœur semble être ralentie chez les individus acclimatés à température réduite. L'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre corrobore donc non seulement la variation de la capacité métabolique au cours de la vie, mais aussi le ralentissement du déclin de l'AS observé chez les individus acclimatés à 22 °C.

CHAPITRE 6 :

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Depuis plus de deux siècles, de nombreuses études ont participé au développement des connaissances sur le vieillissement des organismes. Ce processus progressif et hautement complexe se distingue par une dégradation progressive des fonctions de l'organisme, aboutissant à plus ou moins long terme à sa mort (Kirkwood & Austad, 2000). Certaines études ont notamment permis de révéler que certains facteurs externes, comme la réduction de la température corporelle, favorisaient un accroissement de la longévité des individus. Cependant, l'ensemble des mécanismes déclenchés par ces traitements et participant au ralentissement de la sénescence restent encore mal connus.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse était de caractériser les variations de la fonction cardio-respiratoire au cours du cycle de vie d'un vertébré, *Nothobranchius furzeri*, et d'explorer le rôle régulateur de la température. Cette fonction joue un rôle prépondérant au sein d'un organisme, en permettant l'approvisionnement en substrats (i.e. oxygène, nutriments, ...) nécessaires au fonctionnement de l'ensemble des cellules. Mieux comprendre les modifications et les régulations du système cardio-respiratoire au cours de la vie est donc un élément central dans l'évaluation de la capacité de l'organisme à répondre à ses différents besoins énergétiques.

Pour cela, j'ai utilisé trois approches à différents niveaux d'organisation biologique, la cellule, l'organe et l'individu. Il est important de préciser que cette thèse s'inscrivait au sein du projet ALIVE ("Ageing and functional integrity: modulation by LIfe-extending treatments in a VERtebrate model with extremely short lifespan"), qui avait pour objectif d'étudier, chez *N. furzeri* soumis à deux traitements antiviellissement (i.e. réduction de la température & restriction calorique) les variations de trois fonctions biologiques clés au cours de la sénescence : la fonction immunologique, les performances moteurs et sensorielles et la fonction cardio-respiratoire. Pour cela, un panel d'approches allant du

gène à l'individu a été employé. Les résultats concernant l'effet d'une réduction de température sur le vieillissement obtenus dans le cadre d'ALIVE seront présentés au sein de cette discussion générale, afin de l'enrichir, et d'apporter la vision globale rendu possible par ce projet.

6.1.1 Système cardio-respiratoire au cours de la vie

de *Nothobranchius furzeri*

L'utilisation de la respirométrie statique a permis l'étude des variations de la capacité métabolique au cours du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri* (Chapitre 3). Quelle que soit la température d'acclimatation des poissons (*i.e.* 22 et 26 °C), nous avons démontré la présence de deux phases bien distinctes, délimitées par un âge métabolique optimal (Figure III. 2.): 1) une première phase d'augmentation de la capacité métabolique, associée à une augmentation des besoins énergétiques conséquents à l'importante phase de croissance somatique, puis gonadique au cours du stade juvénile ; 2) une seconde phase correspondant à une diminution de la capacité métabolique, probablement due à la perte progressive de fonctionnalité des mitochondries avec l'âge, induisant une diminution de la capacité aérobie à produire de l'ATP (Phillips et al, 2000). Cette réduction progressive de l'énergie disponible pour les activités d'un organisme pourrait être synonyme de l'entrée en phase de sénescence. Un des éléments fondamentaux mis en évidence par cette étude est donc l'existence d'un âge optimal défini, ici, comme l'âge auquel la capacité métabolique aérobie est maximale. L'approche complémentaire au niveau sub-cellulaire a permis de confirmer les résultats concernant le métabolisme énergétique au cours du vieillissement. En effet, le projet ALIVE a notamment ciblé le gène codant pour la citrate synthase (*i.e.* CS), enzyme localisée dans la matrice mitochondriale et intervenant dès le début du cycle de Krebs (Murillo & Becquet,

communication personnelle, projet ALIVE). Une sur-expression de ce gène pendant le stade juvénile est observée, pour ensuite présenter une sous-expression au-delà de 18 et 30 semaines chez les individus acclimatés respectivement à 26 et 22° C (Figure VI. 1). En complément de l'approche génomique, l'évaluation de la capacité catalytique maximale de la CS dans les muscles squelettiques a permis de quantifier leur potentiel aérobie (Murillo, communication personnelle, projet ALIVE). Quelle que soit la température, cette capacité se trouve diminuée au cours du vieillissement du poisson (Figure VI. 2). L'ensemble de ces résultats concernant le métabolisme converge donc vers un déclin des capacités métaboliques des individus accompagnant le processus de sénescence.

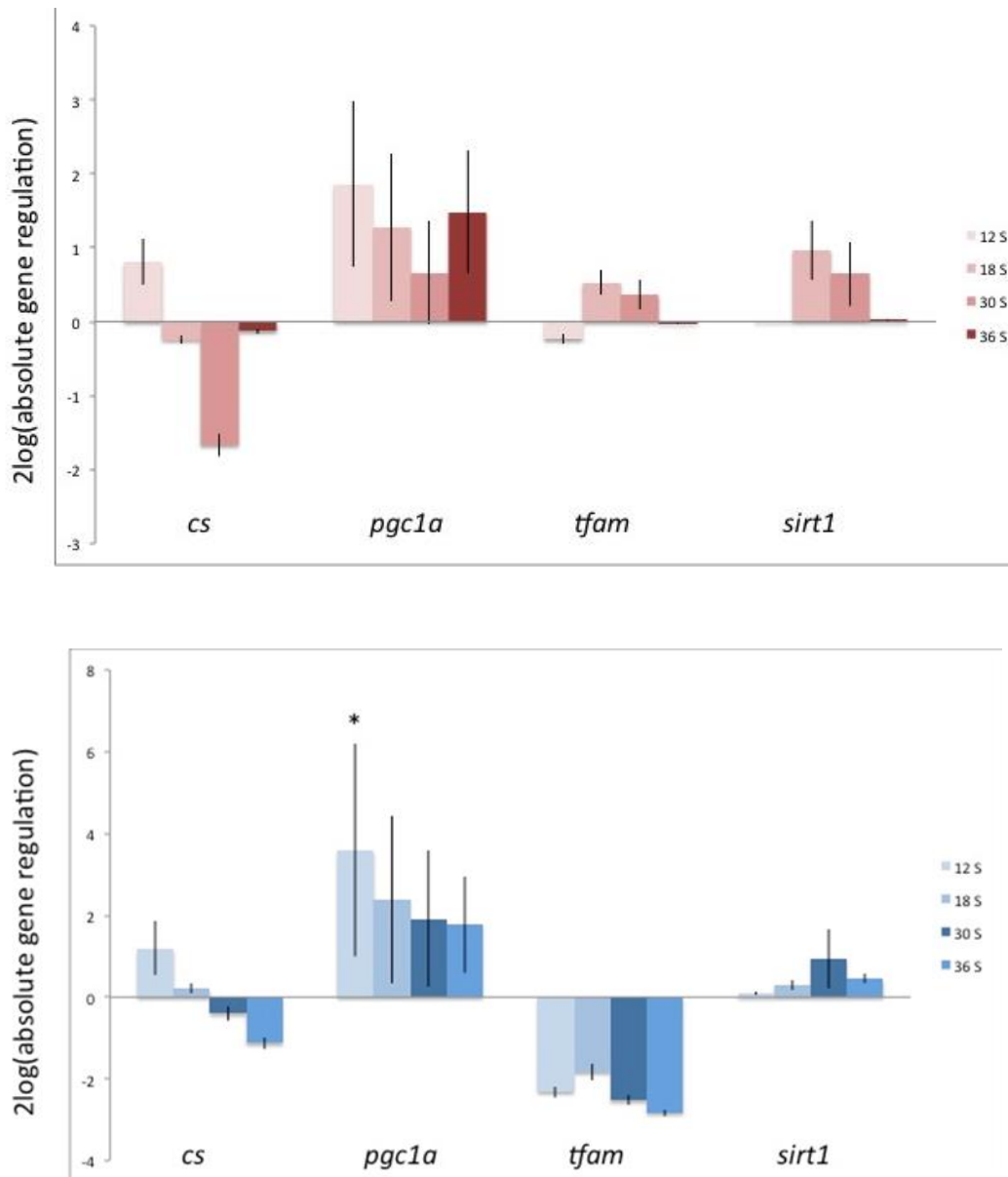


Figure VI. 1 Ratios d'expression de gènes ciblés dans les muscles de *N. furzeri*. Ces ratios correspondent à une expression relative par rapport à une condition de référence (i.e. 7 semaine) et ont été normalisées par l'expression du gène *stox2*. La figure A représente les résultats obtenus chez les individus acclimatés à 26 °C et la figure B représente les résultats obtenus chez les poissons acclimatés à 22 °C. Avec le gène *cs* codant pour la citrate synthase (CS), enzyme localisée dans la matrice mitochondriale et intervenant dès le début du cycle de Krebs; le gène *sirt1* codant pour la sirtuine 1 (SIRT1), enzyme impliquée dans de nombreux processus, comme les mécanismes anti-inflammatoires, la biogénèse des mitochondries, la résistance au stress ou encore la sénescence cellulaire; le gène *pgc1a* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), codant pour un co-activateur transcriptionnel impliqué dans la biogénèse des mitochondries; le gène *tfam* codant pour le facteur transcriptionnel mitochondrial A (TFAM), activateur clé de la transcription mitochondriale. Ces données ont été obtenues avec le logiciel REST version 2 (Pfaffl et al. 2002). Un test t sur les données prises deux à deux avec 10000 permutations a été réalisé afin d'évaluer la significativité des résultats ($p < 0,05$) (Becquet, communication personnelle).

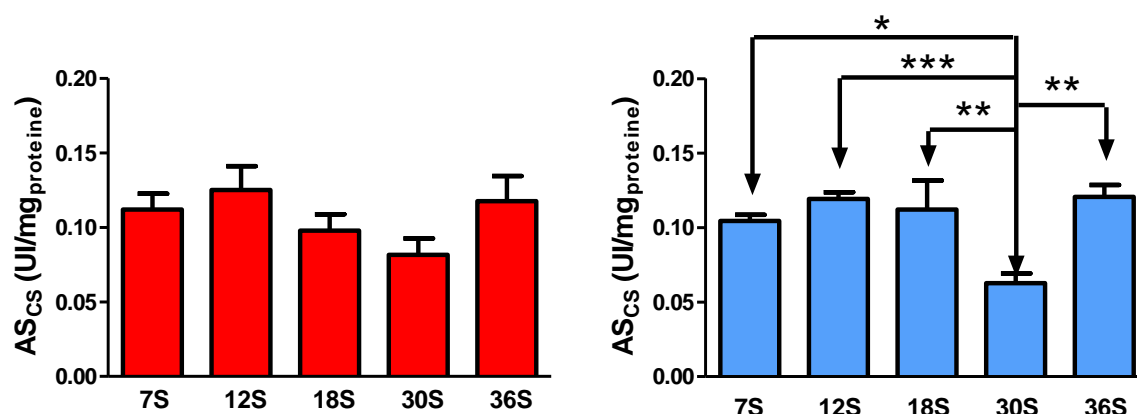


Figure VI. 2 Effet de l'âge et de la température sur l'activité spécifique citrate synthase des muscles de *Nothobranchius furzeri*. Chaque barre d'histogramme représente l'activité spécifique moyenne de la citrate synthase \pm SEM (UI/ mgprotéine) dans les muscles des individus acclimatés à 26°C (histogrammes rouges) et à 22°C (histogrammes bleus). Les manipulations sont effectuées en n=21 à 72 réplicas totaux (7 à 24 réplicas biologiques dosés en triplicatas). Avec S : semaines ; ASCS: Activité Spécifique moyenne de la Citrate Synthase (UI/mgprotéine). L'analyse statistique réalisée avec Prism (GraphPad version 5, 2007) pour étudier les différents âges à chaque température utilise le test de Kruskal-Wallis et un post-test de Dunn. L'analyse statistique réalisée avec Prism (GraphPad version 5, 2007) pour comparer deux températures d'élevage à chaque âge utilise le test de Student. *** pour $p < 0,001$, ** pour $0,001 < p < 0,01$, * pour $0,01 < p < 0,05$ et pas d'indication particulière si $p > 0,05$ (Murillo, communication personnelle).

Le système cardio-vasculaire a un rôle déterminant pour la capacité métabolique des individus. Il permet notamment le transport des nutriments et de l'oxygène, indispensable au métabolisme énergétique aérobie (Priede, 1977 ; Bennett, 1980 ; Claireaux et al., 2005 ; Farrell, 2007). La modulation de l'activité du système cardio-vasculaire au cours du vieillissement, a donc une importance considérable sur le métabolisme de l'organisme (Wood & McDonald, 1997 ; Farrell, 2002, 2007). Une étude complémentaire des performances cardiaques était donc associée à ce travail de thèse au travers de 1) l'étude des changements morphologiques au niveau de l'organe et des cardiomyocytes, et 2) l'analyse du couplage excitation-contraction, phénomène permettant, par des flux de calcium caractéristiques, la contraction des cardiomyocytes. Ces approches ont été couplées à une approche de génomique fonctionnelle ciblant les gènes de certaines protéines impliquées dans les processus de croissance cellulaire et de l'ECC (Becquet,

communication personnelle, projet ALIVE). Les variations morpho-fonctionnelles du cœur concordent avec les changements de capacité métabolique au cours de la vie que nous avons observé. De la phase juvénile à la phase adulte, *Nothobranchius furzeri* acclimaté à sa température optimale présente une croissance du cœur, principalement due au phénomène d'hyperplasie des cardiomyocytes. En effet, nous avons observé une augmentation du ratio masse de cœur / masse du poisson (Table V. 1), sans accroissement du volume des cellules cardiaques. Cela s'accompagne d'une sur-expression du gène *pcna* (marqueur du renouvellement cellulaire ; Figure V. 2) chez les individus âgés de 7 semaines comparés à ceux âgés de 18 semaines. Cette croissance cardiaque lors de la phase juvénile participe à l'accroissement de la circulation sanguine, et ainsi à l'augmentation de l'apport en O₂ et en nutriments aux tissus (Rudolph, 1979 ; Anversa *et al.*, 1983 ; Rakusan, 1984 ; Frey & Olson, 2003). Puis, l'analyse du processus d'ECC a permis de mettre en évidence que l'efficacité de la contraction / relaxation des cellules cardiaques semblait augmenter du stade juvénile au stade adulte. En effet, bien que la quantité de calcium mobilisé ne diffère pas, les cardiomyocytes des poissons âgés de 18 semaines ont des cinétiques d'entrée et de sortie de calcium plus élevées que celles observées aux deux autres âges testés (*i.e.* 7 et 36 semaines). Ainsi, le couplage excitation-contraction se produirait en un laps de temps plus court chez les poissons âgés de 18 semaines en comparaison des individus de 7 semaines, supposant une fréquence cardiaque plus élevée chez ces individus adultes. Ces résultats semblent donc être en accord avec l'élévation de la capacité métabolique que nous avons mis en évidence entre la phase juvénile et la phase adulte chez *Nothobranchius furzeri*. Il est cependant difficile de conclure sur les performances cardiaques, étant donné que d'autres mécanismes que l'ECC rentrent en jeu, dont la force de contraction du cœur, sa sensibilité à l'étirement, la

sensibilité du tissu ventriculaire à la régulation adrénergique, etc. (Chuwa & Rodeheffer, 1995).

Ensuite, une deuxième phase de « croissance » cardiaque est observée entre le stade adulte et sénescence. Cette fois-ci, ce phénomène est principalement dû à une hypertrophie des cardiomyocytes (Table V. 1) confirmée par la sur-expression du gène *rcan1* (marqueur de l'hypertrophie des cellules cardiaques). Ce phénomène d'hypertrophie reflète une défaillance cellulaire due au processus de sénescence (Giordano, 2005). De plus, les résultats d'expression du gène *pgc1* tendent à montrer que l'augmentation de la taille des cellules n'est pas accompagnée d'une augmentation de la biogenèse mitochondriale (Figure IV.1). Ces résultats renforcent l'idée de l'augmentation de la production de ROS. De nombreux auteurs ont incriminé la multiplication des ROS dans le phénomène d'hypertrophie des cardiomyocytes au cours du vieillissement (Anversa *et al.*, 1986a ; Olivetti *et al.*, 1991 ; Lakatta & Levy, 2003 ; Torella *et al.*, 2004 ; Kaushik & Engler, 2014 ; Gonzalez & Barrios, 2015 ; Khrapko *et al.*, 2015 ; Sujkowski & Wessells, 2015). L'hypertrophie du cœur devient, à terme, malade, induisant une fibrose et apoptose de plus en plus importantes, et conduit à une augmentation des maladies cardiaques telles que des infarctus, de l'athérosclérose, etc. (Anversa *et al.*, 1986a ; Olivetti *et al.*, 1991 ; Gates *et al.*, 2003 ; Lakatta & Levy, 2003b ; Suh *et al.*, 2003 ; Hacker *et al.*, 2006). Concernant l'ECC, il a été mis en évidence un déclin de la capacité des cardiomyocytes à se contracter entre les stades adulte et sénescence. En effet, l'étude de ce processus a révélé que les cinétiques des flux de calcium étaient réduites au cours de la phase de sénescence. Ce déclin de l'ECC pourrait être causé par l'hypertrophie du cœur observé au cours de la sénescence. En effet, l'augmentation du volume des cardiomyocytes provoque une prolongation des potentiels d'action, associée à une inactivation importante des canaux calciques de type L.

Ces résultats concordent avec le déclin de la capacité métabolique consécutif à l'âge métabolique optimal de 19 semaines. La capacité métabolique représente la capacité d'un organisme à approvisionner les tissus en oxygène afin de produire l'énergie, sous forme d'ATP, nécessaire à l'ensemble des fonctions physiologiques de l'animal (Fry, 1971, Killen *et al.*, 2011). Une variation de cette AS est donc susceptible d'entraîner des modifications des niveaux d'activité (Priede, 1985 ; Evans, 1990 ; Jourdan-Pineau *et al.*, 2010). Des activités, soit considérées comme étant de bon « proxy » de la fitness d'un individu (*i.e.* croissance, reproduction), soit parmi les plus coûteuses en énergie (*i.e.* digestion, locomotion) ont fait l'objet d'un suivi dans le cadre de ce travail de thèse. Au cours de la phase juvénile, nous avons observé que l'augmentation de la capacité métabolique s'accompagnait d'une élévation de la production d'œufs, et ce jusqu'à l'âge métabolique optimal (Figure IV. 2B). Au contraire, bien que le taux de croissance soit positif lors de cette phase d'augmentation de l'AS, il diminue progressivement avec l'âge des poissons, jusqu'à des valeurs voisines de zéro à l'approche de l'âge métabolique optimal des individus (Figure IV. 2A). Concernant la phase de déclin de la capacité métabolique, elle est associée à une réduction de la plupart des activités que nous avons suivies. En effet, nous avons observé 1) une baisse de l'efficacité de fertilisation des œufs par les mâles, ainsi qu'une réduction du nombre d'œufs produit par les femelles au cours de la sénescence ; 2) La prise alimentaire spontanée, ainsi que l'énergie investie pour la digestion déclinent également avec le vieillissement des individus. Ce ne fût pas le cas des autres activités ayant fait l'objet d'un suivi, *i.e.* la locomotion. La locomotion de routine semble, en effet, ne pas être affectée par le processus de sénescence chez *Nothobranchius furzeri*. Concernant les performances de nage, la vitesse de nage critique ne diminue pas non plus au cours de la sénescence. Par contre, la consommation maximale d'oxygène mesurée au cours du test de nage était inférieure pour les poissons sénescents. Il est donc

possible que les individus âgés ont une nage qui utilise le métabolisme anaérobie précocement au cours du test de nage. Il pourrait donc s'agir d'un shift du métabolisme aérobie vers le métabolisme anaérobie et ce, en réponse au processus de sénescence. Un shift entre métabolisme anaérobie et aérobie en réponse à un stress hypoxique a été observé chez d'autres espèces de téléostéens (*e.g.* la morue franche *Gadus morhua*, Chabot & Claireaux, 2008 ; le poisson zèbre *Danio rerio*, Widmer *et al.*, 2006). Cette hypothèse sera vérifiée ultérieurement grâce à l'analyse des MO_2 qui ont été mesurées sur ses individus directement après le test de nage. De telles mesures permettent d'estimer la dette en oxygène de chacun des individus. Ces résultats seront ensuite inclus dans la publication qui vous a été présentée au sein du chapitre 4 – Partie 2.

6.1.1 Rôle régulateur de la température

En plus d'être l'un des principaux facteurs environnementaux contrôlant la physiologie des téléostéens (Fry, 1947 ; Reynolds & Casterlin, 1979 ; Claireaux & Lefrançois, 2007), la température s'est révélée influencer la durée de vie d'un grand nombre d'espèces d'invertébrés, et de vertébrés, dont les mammifères et les téléostéens (Valenzano *et al.*, 2006a ; Ren *et al.*, 2009, 2011). Ainsi, le rôle régulateur de la température sur les variations du système cardio-respiratoire a été exploré chez *Nothobranchius furzeri*. Un des premiers éléments que nous avons mis en évidence est la confirmation de l'extension de la durée de vie des individus soumis à une réduction de leur température d'acclimatation. Ainsi, l'âge médian (*i.e.* l'âge au-delà duquel seulement 50% de la population testée survit), était décalé de 5,5 semaines chez les individus acclimatés à 22 °C. L'étude de la capacité métabolique a, comme attendu, permis de confirmer la réduction de cette dernière avec la baisse de température (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Une diminution du métabolisme restreint la production de ROS ou « reactive oxygen species »

(Ragland & Sohal, 1975 ; Sohal & Allen, 1986 ; Ku *et al.*, 1993 ; Ku & Sohal, 1993 ; Speakman *et al.*, 2002 ; Speakman, 2003, 2005). Ainsi, les faibles taux métaboliques des individus acclimatés à 22° C pourraient contribuer à la réduction des dommages cellulaires, et ainsi participeraient à l'amélioration de la longévité observée chez *Nothobranchius furzeri*. Nous avons également pu mettre en évidence le décalage de 6,2 semaines de l'âge métabolique optimal chez les individus acclimatés à température réduite, synonyme du retard et du ralentissement du déclin de la capacité métabolique lié au vieillissement.

Les variations de performances cardiaques température-dépendantes sont cohérentes avec le décalage de l'âge métabolique optimal, ainsi qu'avec le ralentissement des processus de sénescence suggéré par le déclin modéré de la capacité métabolique. En effet, le phénomène d'hypertrophie du cœur observé chez les individus sénescents acclimatés à 26 °C n'est pas observé chez les individus les plus âgés acclimatés à 22 °C. De plus, le déclin de la capacité des cardiomyocytes à se contracter semble être également freiné chez les individus acclimatés à 22 °C : bien que la quantité de calcium mobilisée ne diffère pas avec la température, les cinétiques de re-pompage du calcium ne diminuent pas chez les individus sénescents acclimatés à 22 °C, contrairement à ceux exposés à leur température optimale. Ainsi, ces résultats suggèrent que le cœur des poissons acclimatés à 22 °C présente moins de détérioration âge-dépendantes, avec des cardiomyocytes possédant des mécanismes de re-pompage de calcium, donc une capacité de contraction, aussi performante à 36 qu'à 18 semaines.

La diminution de la capacité métabolique due à la réduction de la température d'acclimatation a eu l'effet attendu sur la plupart des activités qui ont été suivies dans ce travail : les poissons mangent un plus faible bol alimentaire, les femelles pondent moins

d'œufs, les mâles sont moins efficaces à féconder les œufs, et l'allocation énergétique envers la SDA est réduite.

Etant donné l'effet régulateur de la température sur les variations de la capacité métabolique au cours du vieillissement de *Nothobranchius furzeri*, nous supposons observer un effet similaire de ce traitement anti-vieillessement sur les niveaux d'activité. Cependant, l'ensemble des variables mesurées au cours de ce travail de thèse n'a pas permis de mettre en évidence de ralentissement du déclin des activités suivies chez les individus acclimatés à température réduite.

Le dernier objectif de cette thèse était d'explorer dans quelle mesure la variation inter-individuelle des performances métaboliques et des niveaux d'activités pouvait participer à moduler la longévité des individus. Cette hypothèse se basait sur les théories du « rate-of-living » (Pearl, 1928 ; Sohal, 1986) et des « radicaux libres » (Harman, 1955, 1992 ; Barja, 2004). Toutes deux supposent que des niveaux d'activités élevés requièrent des taux métaboliques élevés, favorisant la production de ROS. Or, une production importante de ROS accélère la détérioration âge-dépendante des tissus et des organes de ces individus « top performers », ce qui réduirait à terme leur durée de vie. Premièrement, nous n'avons pas pu mettre en évidence que les niveaux d'activités présentés par un individu adulte conditionnaient ses niveaux d'activités une fois devenu sénescient. De plus, aucune des variables que nous avons suivies (*i.e.* capacité métabolique, taux de croissance, nombre d'œufs pondus, taille des œufs, efficacité des mâles à féconder les œufs, interactions mâle/femelle, SDA, performance de locomotion, vitesse de nage de routine) n'a permis de révéler que les différences inter-individuelles de niveaux d'activités étaient associées à des durées de vie spécifiques.

6.1.2 Conclusions et perspectives

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence la présence d'un âge métabolique optimal au stade adulte. La phase de sénescence s'accompagne d'un déclin des capacités métaboliques et des performances cardiaques, associé à un déclin des activités de reproduction, de prise alimentaire, et de digestion. La plupart des résultats mettent en évidence l'effet régulateur de la température sur les mécanismes du vieillissement : la réduction de température induit un décalage de 6,2 semaines de l'âge métabolique optimal, ainsi qu'un ralentissement du déclin de la capacité métabolique et des performances cardiaques. Cependant, plusieurs remarques imposent des limites à nos conclusions :

L'élaboration d'un modèle mathématique a permis d'obtenir les âges métaboliques optimal et critique à partir des données de la capacité métabolique mesurées tout au long de la vie (*i.e.* de 5 à 42 semaines) de *Nothobranchius furzeri*. A 26 °C, le déclin de la capacité métabolique observé au cours de la sénescence semble être fortement ralenti à partir de 36 semaines (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Une première remarque concernant ce modèle est qu'il a été conçu en y incluant les résultats de l'ensemble des âges testés, dont certains au-dessus de la durée de vie moyenne de l'espèce (*i.e.* 37,5 et 32 semaines, respectivement à 22 et 26 °C ; Chapitre 3). Il est probable que les individus vivant au-delà de la durée de vie moyenne (*i.e.* 42 semaines pour les individus acclimatés à 22 °C, et 36 et 42 semaines pour ceux acclimatés à 26 °C) aient des profils physiologiques différents de l'ensemble de la population, ceci leur octroyant une longévité plus importante. Ainsi, ces individus « extrêmes » auraient une sénescence moins avancée que l'ensemble de la population, entraînant un déclin de la capacité

métabolique possiblement ralentit. L'AS mesuré à 36 et 42 semaines a donc pu apporter un biais au modèle.

Une seconde suggestion est à faire : l'avancement du processus de sénescence est hautement variable chez des individus ayant le même âge. Il est même probable que cette variabilité soit accentuée aux âges proches de l'âge métabolique optimal obtenu par le modèle. En effet, alors que certains individus sont encore en phase d'accroissement de la capacité métabolique, certains sont peut-être déjà dans leur stade sénescence, et ont ainsi entamé le déclin de l'AS. Afin d'avoir une estimation la plus proche possible de la réalité physiologique, il serait donc intéressant d'étudier les variations de la capacité métabolique au cours du vieillissement, non pas en testant des âges de poissons différents, mais en testant des individus ayant un processus de sénescence plus ou moins avancé. Même si cette approche reste à valider sur *N. furzeri*, un tel classement des individus en fonction de leur degré de dégradation pourrait peut être être possible grâce à la technique de coloration « smurfs ». Cette approche permet d'identifier les tissus détériorés sur un organisme, donc les individus physiologiquement sénescents ; et ce sans nécessiter l'euthanasie, ou entraîner un quelconque dommage pour le poisson (Rera *et al.*, 2011, 2012 ; Dambroise *et al.*, 2015). La technique de « smurfs » permet de détecter *in vivo* les tissus intestinaux qui deviennent perméables au cours de la sénescence : une coloration bleue apparaît sur le corps des individus ayant les tissus intestinaux perméables, donc qui sont déjà en processus de sénescence, contrairement aux individus non-colorés. Ainsi, grâce à cette technique, il serait donc possible de comparer les résultats obtenus chez les individus adultes puis une fois qu'ils seraient réellement sénescents. Ceci permettrait potentiellement d'avoir des résultats plus clairs. Concernant le suivi individuel qui est présenté dans le chapitre 4, nous n'avons pas mis en évidence de schéma intra-spécifique des variations des niveaux d'activités entre le stade adulte et le

stade sénescence. D'après nos résultats, il ne semble pas non plus y avoir de corrélation entre les niveaux d'activité d'un individu adulte et sa longévité. Une des difficultés rencontrées dans l'établissement de la relation existant entre niveaux d'activités et processus de vieillissement est de prendre en compte l'ensemble des variables mesurées pour chacun des individus. Dans le contexte de cette thèse, les variables mesurées ont été analysées séparément les unes des autres. Cependant, il serait tout à fait pertinent de créer un modèle statistique permettant d'y inclure la globalité des variables étudiées. Cela permettrait d'apporter une analyse globale des différences inter-individuelles, et pourrait aider à comprendre la relation qui existe entre les niveaux d'activité et la cinétique du déclin de l'organisme vieillissant. Ceci peut être envisagé, par exemple, au travers de l'utilisation d'une approche PLS (partial least squares). L'approche PLS fait partie des modèles d'équations structurelles à variables latentes, « méthodes de modélisation de phénomènes apte à bien définir des systèmes complexes en interaction » (Jakobowicz, 2007). Cette méthode est adaptée aux analyses causales prédictives dans des situations de forte complexité et d'information théorique faible, et pourrait donc être pertinente pour notre étude. Ensuite, il faut préciser que les niveaux de certaines activités (*i.e.* locomotion, digestion, interactions mâle/femelle) ont été estimés chez des poissons âgés de plus de 36 semaines. Comme cela a été mentionné précédemment, ces individus de 36 semaines ou plus sont peut-être des « individus extrêmes » vis-à-vis de l'ensemble de la population. Il aurait donc peut-être fallu se concentrer sur des poissons âgés entre 25 et 30 semaines, donc déjà en phase sénescence mais en-deçà de l'âge de survie médian. Ainsi, le nombre d'individus suivis aux deux stades adultes et sénescence aurait aussi été plus important ; la variabilité forte que nous avons observée sur l'ensemble de nos variables en aurait peut-être été réduite.

L'étude des performances cardiaques qui est présentée dans le chapitre 5 décrit les variations morpho-fonctionnelles du cœur au cours de la vie. Ce travail a pu être réalisé par 1) des biométries de cœurs et de cardiomyocytes et 2) par l'étude du phénomène d'ECC. Afin d'avoir une information globale concernant les variations des performances cardiaques au cours du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri*, il paraît donc important de prendre en compte l'ensemble des mécanismes y contribuant. Afin de compléter cette étude, une analyse histo-pathologique de cœur de *N. furzeri* au cours du vieillissement est en cours de réalisation grâce à une collaboration avec l'université de Camerino (Italie). Ceci permettra de caractériser la dégradation du tissu cardiaque induite par le processus de sénescence. De plus, il est envisagé dans un avenir proche, de réaliser des électrocardiogrammes sur les *N. furzeri* afin d'estimer la fréquence de contraction du cœur. Ces mesures permettront de compléter les informations que nous avons obtenues concernant les variations des performances cardiaques au cours du vieillissement.

Une réduction de la température nous a permis de moduler la durée de vie de *Nothobranchius furzeri* et de mettre en évidence le rôle régulateur de la température sur le processus de sénescence. Dans le cadre du projet ALIVE, l'effet d'un autre traitement antvieillissement, la restriction calorique, a été étudié. L'objectif est de savoir si ces deux traitements antvieillissement agissent sur la durée de vie en déclenchant des mécanismes similaires. Dans ce contexte, il serait intéressant de savoir si les individus soumis à une restriction calorique observent un même décalage de leur âge métabolique optimal associé à un ralentissement de leur capacité métabolique ; ou si ce traitement antvieillissement entraîne une modulation différente de la capacité métabolique au cours de la vie. De tels résultats permettraient de confirmer ou d'infirmer le fait que l'allongement de la durée de vie s'accompagne d'un décalage de l'âge métabolique optimal, associé à un ralentissement du déclin des capacités métaboliques.

Afin d'augmenter les connaissances sur le processus de vieillissement, il serait également intéressant de réaliser une étude pluri-générationnelle sur cette espèce à très courte durée de vie. Il serait tout à fait possible d'identifier la longévité des parents puis de leur descendance afin de savoir si la durée de vie est un caractère héritable. Ensuite, il serait intéressant d'explorer le caractère héritable de l'âge métabolique optimal, donc de l'âge d'entrée en phase de sénescence, et des cinétiques du déclin de l'AS du à l'âge.

L'ensemble des perspectives évoquées ci-dessus permettront d'approfondir les connaissances concernant les régulations de la fonction cardio-respiratoire au cours de la vie des vertébrés, mais également aideront à la compréhension des mécanismes de régulation du vieillissement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aas, G. H., Refstie, T. and Gjerde, B.** (1991). Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquacult.* 95, 125–132.
- Aho, E. and Vornanen, M.** (1998). Ca^{2+} -ATPase activity and Ca^{2+} uptake by sarcoplasmic reticulum in fish heart: effects of thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* 201, 525–532.
- Aho, E. and Vornanen, M.** (1999). Contractile properties of atrial and ventricular myocardium of the heart of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effects of thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* 202, 2663–2677.
- Aho, E. and Vornanen, M.** (2001). Cold acclimation increases basal heart rate but decreases its thermal tolerance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Comp. Physiol. B* 171, 173–179.
- Alsop, D. and Wood, C.** (1997). The interactive effects of feeding and exercise on oxygen consumption, swimming performance and protein usage in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 200, 2337–2346.
- Angilletta, M. J., Steury, T. D. and Sears, M. W.** (2004). Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: fitting pieces of a life-history puzzle. *Integr. Comp. Biol.* 44, 498–509.
- Anversa, P., Olivetti, G. and Loud, A.** (1983). Morphometric studies of left ventricular hypertrophy. *Perspect. Cardiovasc. Res.* 8, 27–39.
- Anversa, P., Ricci, R. and Olivetti, G.** (1986a). Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J. Am. Coll. Cardiol.* 7, 1140–1149.
- Anversa, P., Hiler, B., Ricci, R., Guideri, G. and Olivetti, G.** (1986b). Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* 8, 1441–1448.

Anversa, P., Palackal, T., Sonnenblick, E. H., Olivetti, G., Meggs, L. G. and Capasso, J. M. (1990). Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ. Res.* 67, 871–885.

Apanius, V. (1998). *Advances in the Study of Behavior: Stress and Behavior.* Academic Press.

B

Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483–495.

Ball, M. and Parker, G. (1996). Sperm competition games: External fertilization and “adaptive” infertility. *J. Theor. Biol.* 180, 141–150.

Barja, G. (2004). Free radicals and aging. *Trends Neurosci.* 27, 595–600.

Bartke, A., Wright, J. C., Mattison, J. A., Ingram, D. K., Miller, R. A. and Roth, G. S. (2001). Longevity: Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* 414, 412–412.

Beal, M. F. (2005). Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Ann. Neurol.* 58, 495–505.

Beamish, F. W. (1978). Swimming capacity. *Locomotion* 101.

Beamish, F. W. H., Sitja-Bobadilla, A., Jebbink, J. A. and Woo, P. T. K. (1996). Bioenergetic cost of cryptobiosis in fish: rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* infected with *Cryptobia salmositica* and with an attenuated live vaccine. *Dis. Aquat. Organ.* 25, 1–8.

Beckman, K. B. and Ames, B. N. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev.* 78, 547–581.

- Bejma, J., Ramires, P. & Ji, L.** (2000). Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol. Scand.* 169, 343–351.
- Bennett, A. F.** (1980). The Metabolic Foundations of Vertebrate Behavior. *BioScience* 30, 452–456.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L.** (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529.
- Bers, D. M.** (2000). Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. *Circ. Res.* 87, 275–281.
- Bers, D. M., Bridge, J. H. and Spitzer, K. W.** (1989). Intracellular Ca^{2+} transients during rapid cooling contractures in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* 417, 537–553.
- Bers, D. M., Bassani, J. and Bassani, R. A.** (1993). Competition and redistribution among calcium transport systems in rabbit cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 27, 1772–1777.
- Beuckelmann, D., Näbauer, M. and Erdmann, E.** (1992). Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85, 1046–1055.
- Biesmeijer, J. C. and Tóth, E.** (1998). Individual foraging, activity level and longevity in the stingless bee *Melipona beecheii* in Costa Rica (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Insectes Sociaux* 45, 427–443.
- Bjorndal, K. A., Bolten, A. B. and Martins, H. R.** (2000). Somatic growth model of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta*: duration of pelagic stage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 202, 265–272.
- Blank, J. M., Morrisette, J. M., Landeira-Fernandez, A. M., Blackwell, S. B., Williams, T. D. and Block, B. A.** (2004). In situ cardiac performance of Pacific bluefin tuna hearts in response to acute temperature change. *J. Exp. Biol.* 207, 881–890.
- Blažek, R., Poláček, M. and Reichard, M.** (2013). Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. *EvoDevo* 4, 24.

- Braeckman, B. P., Demetrius, L. and Vanfleteren, J. R.** (2006). The dietary restriction effect in *C. elegans* and humans: is the worm a one-millimeter human? *Biogerontol.* 7, 127–133.
- Brand, M. D.** (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* 35, 811–820.
- Brett, J.** (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish. Board Can.* 21, 1183–1226.
- Brett, J. R.** (1969). Temperature and fish. *Chesap. Sci.* 10, 275–276.
- Brett, J.** (1976). Scope for metabolism and growth of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, and some related energetics. *J. Fish. Board Can.* 33, 307–313.
- Brett, J.** (1979). 10 Environmental Factors and Growth. *Fish Physiol.* 8, 599–675.
- Brett, J. and Glass, N.** (1973). Metabolic rates and critical swimming speeds of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in relation to size and temperature. *J. Fish. Board Can.* 30, 379–387.
- Brett, J. R. and Groves, T. D. D.** (1979). 6 Physiological Energetics. In *Fish Physiology* (ed. W.S. Hoar, D. J. R. and J. R. B.), pp. 279–352. Academic Press.
- Bridge, J. H., Spitzer, K. W. and Ershler, P. R.** (1988). Relaxation of isolated ventricular cardiomyocytes by a voltage-dependent process. *Science* 241, 823–825.
- Brooks, S., Tyler, C. R. and Sumpter, J. P.** (1997). Egg quality in fish: what makes a good egg? *Rev. Fish Biol. Fish.* 7, 387–416.
- Bruckdorfer, R.** (2005). The basics about nitric oxide. *Mol. Aspects Med.* 26, 3–31.
- Brys, K., Vanfleteren, J. R. and Braeckman, B. P.** (2007). Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* 42, 845–851.

- Burel, C., Ruyet, P., Gaumet, F., Le Roux, A., Severe, A. and Boeuf, G.** (1996). Effects of temperature on growth and metabolism in juvenile turbot. *J. Fish Biol.* 49, 678–692.
- Burger, J. M. S., Buechel, S. D. and Kawecki, T. J.** (2010). Dietary restriction affects lifespan but not cognitive aging in *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 9, 327–335.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W. and Shipley, G. L.** (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Butler, P. and Metcalfe, J.** (1988). Cardiovascular and respiratory systems. In *Physiology of elasmobranch fishes*, pp. 1–47. Springer.

C

- Cadenas, E. and Davies, K. J. A.** (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging¹. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.
- Calow, P.** (1985). Adaptive Aspects of Energy Allocation. In *Fish Energetics* (ed. Tytler, P. and Calow, P.), pp. 13–31. Springer Netherlands.
- Cameron, J. S.** (1979). Autonomic nervous tone and regulation of heart rate in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 63, 341–349.
- Campbell, K. L., McIntyre, I. and MacArthur, R. A.** (2000). Postprandial heat increment does not substitute for active thermogenesis in cold-challenged star-nosed moles (*Condylura cristata*). *J. Exp. Biol.* 203, 301–310.
- Campisi, J.** (1999). Cancer, aging and cellular senescence. *Vivo Athens Greece* 14, 183–188.
- Cannas, M., Atzori, F., Rupsard, F., Bustamante, P., Loizeau, V. and Lefrançois, C.** (2013). PCBs contamination does not alter aerobic metabolism and tolerance to hypoxia of juvenile sole (*Solea solea* L. 1758). *Aquat. Toxicol.* 127, 54–60.

- Carallo, C., Irace, C., De Franceschi, M., Coppoletta, F., Tiriolo, R., Scicchitano, C., Scavelli, F. and Gnasso, A.** (2010). The effect of aging on blood and plasma viscosity. An 11.6 years follow-up study. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 47, 67–74.
- Carreño, J. E., Apablaza, F., Ocaranza, M. P. and Jalil, J. E.** (2006). Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events. *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed.* 59, 473–486.
- Casselman, J.** (1987). Determination of age and growth. *Biol. Fish Growth* 209–242.
- Casselman, S. J., Schulte-Hostedde, A. I. and Montgomerie, R.** (2006). Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 63, 2119–2125.
- Cellerino, A., Valenzano, D. and Reichard, M.** (2015). From the bush to the bench: the annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology. *Biological Reviews*.
- Chabot, D. and Claireaux, G.** (2008). Environmental hypoxia as a metabolic constraint on fish: The case of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 287–294.
- Chabot, D. and Dutil, J.-D.** (1999). Reduced growth of Atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions. *J. Fish Biol.* 55, 472–491.
- Chambers, K. C. and Phoenix, C. H.** (1984). Testosterone and the decline of sexual behavior in aging male rats. *Behav. Neural Biol.* 40, 87–97.
- Chambers, K. C., Thornton, J. E. and Roselli, C. E.** (1991). Age-related deficits in brain androgen binding and metabolism, testosterone, and sexual behavior of male rats. *Neurobiol. Aging* 12, 123–130.
- Chappell, M. A., Rezende, E. L. and Hammond, K. A.** (2003). Age and aerobic performance in deer mice. *J. Exp. Biol.* 206, 1221–1231.
- Chatelier, A., Imbert, N., Infante, J. L. Z., McKenzie, D. J. and Bois, P.** (2006). Effects of oleic acid on the high threshold barium current in seabass *Dicentrarchus labrax* ventricular myocytes. *J. Exp. Biol.* 209, 4033–4039.

- Ciereszko, A., Liu, L. and Dabrowski, K.** (1996). Effects of season and dietary ascorbic acid on some biochemical characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) semen. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 1–10.
- Claireaux, G. and Lagardère, J.-P.** (1999). Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *J. Sea Res.* 42, 157–168.
- Claireaux, G. and Lefrançois, C.** (2007). Linking environmental variability and fish performance: integration through the concept of scope for activity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 362, 2031–2041.
- Claireaux, G., Webber, D. M., Lagardère, J.-P. and Kerr, S. R.** (2000). Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Sea Res.* 44, 257–265.
- Claireaux, G., McKenzie, D. J., Genge, A. G., Chatelier, A., Aubin, J. and Farrell, A. P.** (2005). Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 208, 1775–1784.
- Claireaux, G., Couturier, C. and Groison, A.-L.** (2006). Effect of temperature on maximum swimming speed and cost of transport in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Exp. Biol.* 209, 3420–3428.
- Clark, T. D., Sandblom, E. and Jutfelt, F.** (2013). Aerobic scope measurements of fishes in an era of climate change: respirometry, relevance and recommendations. *J. Exp. Biol.* 216, 2771–2782.
- Cohen, H. Y., Miller, C., Bitterman, K. J., Wall, N. R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K. T., Gorospe, M., Cabo, R. de and Sinclair, D. A.** (2004). Calorie Restriction Promotes Mammalian Cell Survival by Inducing the SIRT1 Deacetylase. *Science* 305, 390–392.
- Comfort, A.** (1963). Effect of Delayed and Resumed Growth on the Longevity of a Fish (*Lebistes reticulatus*, Peters) in Captivity. *Gerontol.* 8, 150–155.
- Comfort, A.** (1979). *The biology of senescence*. Elsevier.
- Conti, B., Sanchez-Alavez, M., Winsky-Sommerer, R., Morale, M. C., Lucero, J., Brownell, S., Fabre, V., Huitron-Resendiz, S., Henriksen, S., Zorrilla, E. P.,**

- De Lecea, L., Bartfai, T.** (2006). Transgenic Mice with a Reduced Core Body Temperature Have an Increased Life Span. *Science* 314, 825–828.
- Cooke, S. J., Grant, E. C., Schreer, J. F., Philipp, D. P. and Devries, A. L.** (2003). Low temperature cardiac response to exhaustive exercise in fish with different levels of winter quiescence. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 134, 157–165.
- Costa, M. J., Olle, C. D., Rantin, F. T. and Kalinin, A. L.** (2005). Influence of temperature on calcium sensitivity in the ventricular myocardium of the South American lungfish: Effects of extracellular calcium and adrenaline. *J. Therm. Biol.* 30, 259–266.
- Costa, I. A. S. F., Hein, T. W. and Gamperl, A. K.** (2015). Cold-acclimation leads to differential regulation of the steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) coronary microcirculation. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 308, R743–R754.
- Coyne, M. D., Kim, C. S., Cameron, J. S. and Gwathmey, J. K.** (2000). Effects of temperature and calcium availability on ventricular myocardium from rainbow trout. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R1535–R1544.
- Craig, J.** (1985). Aging in fish. *Can. J. Zool.* 63, 1–8.
- Crawshaw, L. I.** (1984). Low-temperature dormancy in fish. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 246, R479–R486.
- Crocker, C. E. and Cech Jr, J. J.** (1997). Effects of environmental hypoxia on oxygen consumption rate and swimming activity in juvenile white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, in relation to temperature and life intervals. *Environ. Biol. Fishes* 50, 383–389.
- D**
- Dabrowski, K.** (1985). Can coregonid fish larvae feed under the ice? *Arch. Für Hydrobiol.* 104, 427–432.

- Dai, D.-F. and Rabinovitch, P. S.** (2009). Cardiac Aging in Mice and Humans: The Role of Mitochondrial Oxidative Stress. *Trends Cardiovasc. Med.* 19, 213–220.
- D'Alessio, D., Kavle, E., Mozzoli, M., Smalley, K., Polansky, M., Kendrick, Z., Owen, L., Bushman, M., Boden, G. and Owen, O.** (1988). Thermic effect of food in lean and obese men. *J. Clin. Invest.* 81, 1781.
- Dambroise, E., Monnier, L., Ruisheng, L., Aguilaniu, H., Joly, J.-S., Tricoire, H. and Rera, M.** (2015). Two phases of aging separated by the Smurf transition as a public path to death. *bioRxiv* 028183.
- Dao, A., Kassogue, Y., Adamou, A., Diallo, M., Yaro, A. S., Traore, S. F. and Lehmann, T.** (2010). Reproduction-Longevity Trade-Off in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 47, 769–777.
- Date, M., Morita, T., Yamashita, N., Nishida, K., Yamaguchi, O., Higuchi, Y., Hirotani, S., Matsumura, Y., Hori, M. and Tada, M.** (2002). The antioxidant N-2-mercaptopropionyl glycine attenuates left ventricular hypertrophy in in vivo murine pressure-overload model. *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 907–912.
- Del Toro-Silva, F. M., Miller, J. M., Taylor, J. C. and Ellis, T. A.** (2008). Influence of oxygen and temperature on growth and metabolic performance of *Paralichthys lethostigma* (Pleuronectiformes: Paralichthyidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 358, 113–123.
- Di Cicco, E., Tozzini, E. T., Rossi, G. and Cellerino, A.** (2011). The short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri* shows a typical teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. *Exp. Gerontol.* 46, 249–256.
- Di Lisa, F., Menabò, R., Canton, M. and Petronilli, V.** (1998). The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1366, 69–78.
- Donelson, J., Munday, P., McCormick, M., Pankhurst, N. and Pankhurst, P.** (2010). Effects of elevated water temperature and food availability on the reproductive performance of a coral reef fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 401, 233–243.
- Driedzic, W. R. and Gesser, H.** (1988). Differences in Force-Frequency Relationships and Calcium Dependency Between Elasmobranch and Teleost Hearts. *J. Exp. Biol.* 140, 227–241.

Dupont-Prinet, A. (2009). Physiologie cardio-respiratoire du loup, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) : mécanismes de base et implications écologiques. Montpellier 2.

Dupont-Prinet, A., Claireaux, G. and McKenzie, D. J. (2009). Effects of feeding and hypoxia on cardiac performance and gastrointestinal blood flow during critical speed swimming in the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 154, 233–240.

Dupont-Prinet, A., Chatain, B., Grima, L., Vandeputte, M., Claireaux, G. and McKenzie, D. J. (2010). Physiological mechanisms underlying a trade-off between growth rate and tolerance of feed deprivation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Exp. Biol.* 213, 1143–1152.

Duthie, G. G. (1982). The respiratory metabolism of temperature-adapted flatfish at rest and during swimming activity and the use of anaerobic metabolism at moderate swimming speeds. *J. Exp. Biol.* 97, 359–373.

E

Eisner, D., Choi, H., Diaz, M., O’neill, S. and Trafford, A. (2000). Integrative analysis of calcium cycling in cardiac muscle. *Circ. Res.* 87, 1087–1094.

Eliason, E. J., Higgs, D. A. and Farrell, A. P. (2008). Postprandial gastrointestinal blood flow, oxygen consumption and heart rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 149, 380–388.

Epstein, F. H., Hunter, J. J. and Chien, K. R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N. Engl. J. Med.* 341, 1276–1283.

Evans, D. O. (1990). Metabolic Thermal Compensation by Rainbow Trout: Effects on Standard Metabolic Rate and Potential Usable Power. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119, 585–600.

Evers, B. M., Townsend Jr, C. and Thompson, J. (1994). Organ physiology of aging. *Surg. Clin. North Am.* 74, 23–39.

F

- Fabiato, A.** (1983). Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 245, C1–C14.
- Farrell, A. P.** (1982). Cardiovascular changes in the unanaesthetized lingcod (*Ophiodon elongatus*) during short-term, progressive hypoxia and spontaneous activity. *Can. J. Zool.* 60, 933–941.
- Farrell, A. P.** (2002). Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: insights into cardiovascular design limitations in fishes.
- Farrell, A. P.** (2007). Cardiorespiratory performance during prolonged swimming tests with salmonids: a perspective on temperature effects and potential analytical pitfalls. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 362, 2017–2030.
- Farrell, A. P. and Jones, D. R.** (1992). The heart. *Cardiovasc. Syst.* 12, 1–88.
- Farrell, A. P., Davie, P. S., Franklin, C. E., Johansen, J. A. and Brill, R. W.** (1992). Cardiac physiology in tunas. I. In vitro perfused heart preparations from yellowfin and skipjack tunas. *Can. J. Zool.* 70, 1200–1210.
- Farris, P. K.** (2015). Resveratrol, the longevity molecule. *Dermatol. Times*.
- Fernández, J. R., Grant, M. D., Tulli, N. M., Karkowski, L. M. and McClearn, G. E.** (1999). Differences in locomotor activity across the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 34, 621–631.
- Ferrari, R., Agnoletti, L., Comini, L., Gaia, G., Bachetti, T., Cargnoni, A., Ceconi, C., Curello, S. & Visioli, O.** (1998). Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur. Heart J.* 19, B2–11.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J.** (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.

- Fischmeister, R. and Horackova, M.** (1983). Variation of intracellular Ca^{2+} following Ca^{2+} current in heart. A theoretical study of ionic diffusion inside a cylindrical cell. *Biophys. J.* 41, 341–348.
- Fleming, I. A. and Gross, M. R.** (1990). Latitudinal clines: a trade-off between egg number and size in Pacific salmon. *Ecology* 2–11.
- Flood, J. F., Farr, S. A., Kaiser, F. E., La Regina, M. and Morley, J. E.** (1995). Age-related decrease of plasma testosterone in SAMP8 mice: replacement improves age-related impairment of learning and memory. *Physiol. Behav.* 57, 669–673.
- Flores, I., Cayuela, M. L. and Blasco, M. A.** (2005). Effects of Telomerase and Telomere Length on Epidermal Stem Cell Behavior. *Science* 309, 1253–1256.
- Frey, N. and Olson, E.** (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 45–79.
- Fry, F. E. J.** (1947). Effects of the environment on animal activity.
- Fry, F. E. J.** (1971). 1 The Effect of Environmental Factors on the Physiology of Fish. In *Fish Physiology* (ed. Randall, W. S. H. and D. J.), pp. 1–98. Academic Press.
- Fu, S., Xie, X. and Cao, Z.** (2005). Effect of meal size on postprandial metabolic response in southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 140, 445–451.
- Fuente, M. D. I. and Miquel, J.** (2009). An Update of the Oxidation-Inflammation Theory of Aging: The Involvement of the Immune System in Oxi-Inflamm-Aging. *Curr. Pharm. Des.* 15, 3003–3026.
- Furnell, D. J.** (1987). Partitioning of locomotor and feeding metabolism in sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Can. J. Zool.* 65, 486–489.

G

- Gamperl, A. K. and Farrell, A.** (2004). Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *J. Exp. Biol.* 207, 2539–2550.
- Gates, P. E., Tanaka, H., Graves, J. and Seals, D. R.** (2003). Left ventricular structure and diastolic function with human ageing. *Eur. Heart J.* 24, 2213–2220.
- Gavrilov, L. A. and Gavrilova, N. S.** (2002). Evolutionary Theories of Aging and Longevity. *Sci. World J.* 2, 339–356.
- Gehrke, P. C.** (1988). Response surface analysis of teleost cardio-respiratory responses to temperature and dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 89, 587–592.
- Gehrke, P. C. and Fielder, D. R.** (1988). Effects of temperature and dissolved oxygen on heart rate, ventilation rate and oxygen consumption of spangled perch, *Leiopotherapon unicolor* (Günther 1859), (Percidae, Teraponidae). *J. Comp. Physiol. B* 157, 771–782.
- Genade, T., Benedetti, M., Terzibasi, E., Roncaglia, P., Valenzano, D. R., Cattaneo, A. and Cellerino, A.** (2005). Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell* 4, 223–233.
- Gerhard, G. S., Kauffman, E. J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J. L., Kasales, C. J., Demidenko, E. and Cheng, K. C.** (2002). Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp. Gerontol.* 37, 1055–1068.
- Gilbert, M. J., Zerulla, T. C. and Tierney, K. B.** (2014). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of aging and exercise: Physical ability and trainability decrease with age. *Exp. Gerontol.* 50, 106–113.
- Goldberg, E. L., Romero-Aleshire, M. J., Renkema, K. R., Ventevogel, M. S., Chew, W. M., Uhrlaub, J. L., Smithey, M. J., Limesand, K. H., Sempowski, G. D., Brooks, H. L., *et al.*** (2015). Lifespan-extending caloric restriction or mTOR inhibition impair adaptive immunity of old mice by distinct mechanisms. *Aging Cell* 14, 130–138.

- Gomez, A., Cheng, H., Lederer, W. and Bers, D.** (1996). Ca^{2+} diffusion and sarcoplasmic reticulum transport both contribute to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decline during Ca^{2+} sparks in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* 496, 575.
- Gonzalez, D. R. and Barrios, G. B.** (2015). The Effect of Aging on Calcium Transients in Rat Cardiomyocytes: Impact of NOX Inhibition. *Biophys. J.* 108, 268a.
- Gophen, M.** (1976). Temperature effect on lifespan, metabolism, and development time of *Mesocyclops leuckarti* (Claus). *Oecologia* 25, 271–277.
- Gray, G.** (1978). Changes in the levels of luteinizing hormone and testosterone in the circulation of ageing male rats. *J. Endocrinol.* 76, 551–552.
- Guerra, L., Cerbai, E., Gessi, S., Borea, P. A. and Mugelli, A.** (1996). The effect of oxygen free radicals on calcium current and dihydropyridine binding sites in guinea-pig ventricular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* 118, 1278–1284.
- Guinea, J. and Fernandez, F.** (1997). Effect of feeding frequency, feeding level and temperature on energy metabolism in *Sparus aurata*. *Aquacult.* 148, 125–142.

H

- Hacker, T. A., McKiernan, S. H., Douglas, P. S., Wanagat, J. and Aiken, J. M.** (2006). Age-related changes in cardiac structure and function in Fischer 344 × Brown Norway hybrid rats. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 290, H304–H311.
- Hamada, Y., Udon, T., Teramoto, M. and Sugawara, M.** (1996). The growth pattern of chimpanzees: Somatic growth and reproductive maturation in Pan troglodytes - Springer.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.** (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflüg. Arch.* 391, 85–100.
- Hansford, R. G.** (1983). Bioenergetics in aging. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Bioenerg.* 726, 41–80.

- Harley, C. B., Vaziri, H., Counter, C. M. and Allsopp, R. C.** (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol.* 27, 375–382.
- Harman, D.** (1955). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.
- Harman, D.** (1981). The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7124–7128.
- Harman, D.** (1992). Free radical theory of aging. *Mutat. Res.* 275, 257–266.
- Harper, A. A., Newton, I. P. and Watt, P. W.** (1995). The effect of temperature on spontaneous action potential discharge of the isolated sinus venosus from winter and summer plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Exp. Biol.* 198, 137–140.
- Hartmann, N., Reichwald, K., Lechel, A., Graf, M., Kirschner, J., Dorn, A., Terzibasi, E., Wellner, J., Platzer, M. and Rudolph, K. L.** (2009). Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Mech. Ageing Dev.* 130, 290–296.
- Hasenöhl, R. U., Frisch, C., Nikolaus, S. and Huston, J. P.** (1994). Chronic administration of neurokinin SP improves maze performance in aged *Rattus norvegicus*. *Behav. Neural Biol.* 62, 110–120.
- Hayflick, L.** (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636.
- He, X., Liu, Y., Sharma, V., Dirksen, R. T., Waugh, R., Sheu, S.-S. and Min, W.** (2003). ASK1 associates with troponin T and induces troponin T phosphorylation and contractile dysfunction in cardiomyocytes. *Am. J. Pathol.* 163, 243–251.
- Hemmer-Brepson, C., Replumaz, L., Romestaing, C., Voituron, Y. and Daufresne, M.** (2014). Non-stressful temperature effect on oxidative balance and life history traits in adult fish (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Biol.* 217, 274–282.
- Henken, A. M. and Brandsma, H. A.** (1982). The Effect of Environmental Temperature on Immune Response and Metabolism of the Young Chicken. 2. Effect of the Immune Response to Sheep Red Blood Cells on Energy Metabolism. *Poult. Sci.* 61, 1667–1673.

- Herbing, I. H. and White, L.** (2002). The effects of body mass and feeding on metabolic rate in small juvenile Atlantic cod. *J. Fish Biol.* 61, 945–958.
- Herraiz-Martínez, A., Álvarez-García, J., Llach, A., Molina, C. E., Fernandes, J., Ferrero-Gregori, A., Rodríguez, C., Vallmitjana, A., Benítez, R., Padró, J. M., et al.** (2015). Ageing is associated with deterioration of calcium homeostasis in isolated human right atrial myocytes. *Cardiovasc. Res.*
- Hicks, J. W. and Bennett, A. F.** (2004). Eat and run: prioritization of oxygen delivery during elevated metabolic states. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 144, 215–224.
- Hillerås, P. K., Jorm, A. F., Herlitz, A. and Winblad, B.** (1999). Activity patterns in very old people: a survey of cognitively intact subjects aged 90 years or older. *Age Ageing* 28, 147–152.
- Holloszy, J. O. and Smith, E. K.** (1986). Longevity of cold-exposed rats: a reevaluation of the “rate-of-living theory.” *J. Appl. Physiol.* 61, 1656–1660.
- Hosono, R., Mitsui, Y., Sato, Y., Aizawa, S. and Miwa, J.** (1982). Life span of the wild and mutant nematode *Caenorhabditis elegans*: Effects of Sex, Sterilization, and Temperature. *Exp. Gerontol.* 17, 163–172.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.-L., et al.** (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191–196.
- Hüser, J., Lipsius, S. and Blatter, L.** (1996). Calcium gradients during excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J. Physiol.* 494, 641–651.

I

- Imbert-Auvray, N., Mercier, C., Huet, V. and Bois, P.** (2013). Sarcoplasmic reticulum: a key factor in cardiac contractility of sea bass *Dicentrarchus labrax* and common sole *Solea solea* during thermal acclimations. *J. Comp. Physiol. B* 183, 477–489.

J

- Jakobowicz, E.** (2007). Contributions aux modèles d'équations structurelles à variables latentes. (Doctoral dissertation, Conservatoire national des arts et métiers-CNAM).
- Jiménez-Moreno, R., Wang, Z.-M., Gerring, R. C. and Delbono, O.** (2008). Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release declines in muscle fibers from aging mice. *Biophys. J.* 94, 3178–3188.
- Joaquim, N., Wagner, G. N. and Gamperl, A. K.** (2004). Cardiac function and critical swimming speed of the winter flounder (*Pleuronectes americanus*) at two temperatures. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 138, 277–285.
- Jobling, M.** (1981). The influences of feeding on the metabolic rate of fishes: a short review. *J. Fish Biol.* 18, 385–400.
- Jobling, M.** (1982). A study of some factors affecting rates of oxygen consumption of plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Fish Biol.* 20, 501–516.
- Jobling, M.** (1994). Respiration and metabolism. *Fish Bioenerg.* 8, 121–146.
- Jones, D. R. and Randall, D. J.** (1979). 7 The Respiratory and Circulatory Systems During Exercise. *Fish Physiol.* 7, 425–501.
- Jordan, A. D. and Steffensen, J. F.** (2007). Effects of ration size and hypoxia on specific dynamic action in the cod. *Physiol. Biochem. Zool.* 80, 178–185.
- Jourdan-Pineau, H., Dupont-Prinet, A., Claireaux, G. and McKenzie, D. J.** (2010). An investigation of metabolic prioritization in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Physiol. Biochem. Zool.* 83, 68–77.

K

- Kahan, T. and Bergfeldt, L.** (2005). Left ventricular hypertrophy in hypertension: its arrhythmogenic potential. *Heart* 91, 250–256.
- Kaushik, G. and Engler, A. J.** (2014). *Mechanotransduction*. Academic Press.
- Kealy, R. D., Lawler, D. F., Ballam, J. M., Mantz, S. L., Biery, D. N., Greeley, E. H., Lust, G., Segre, M., Smith, G. K. and Stowe, H. D.** (2002). Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 1315–1320.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. and Tabtiang, R.** (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461–464.
- Khrapko, K., Trayanova, N. and Nattel, S.** (2015). Modeling the Aging Heart: From Local Respiratory Defects to Global Rhythm Disturbances. *Cell Metab.* 21, 662–663.
- Killen, S. S., Marras, S., Steffensen, J. F. and McKenzie, D. J.** (2011). Aerobic capacity influences the spatial position of individuals within fish schools. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* rspb20111006.
- Kirkwood, T. B. L.** (2005). Understanding the Odd Science of Aging. *Cell* 120, 437–447.
- Kirkwood, T. B. L. and Austad, S. N.** (2000). Why do we age? *Nature* 408, 233–238.
- Kishi, S.** (2004). Functional aging and gradual senescence in zebrafish. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 521–526.
- Kishi, S., Uchiyama, J., Baughman, A. M., Goto, T., Lin, M. C. and Tsai, S. B.** (2003). The zebrafish as a vertebrate model of functional aging and very gradual senescence. *Exp. Gerontol.* 38, 777–786.
- Kitani, K.** (1990). Aging and the liver. *Prog. Liver Dis.* 9, 603–623.
- Kleiman, R. B. and Houser, S. R.** (1988). Calcium currents in normal and hypertrophied isolated feline ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 255, H1434–H1442.

- Kooijman, S. A. L. M. and Lika, K.** (2014). Comparative energetics of the 5 fish classes on the basis of dynamic energy budgets. *J. Sea Res.* 94, 19–28.
- Kozłowski, J.** (1992). Optimal allocation of resources to growth and reproduction: Implications for age and size at maturity. *Trends Ecol. Evol.* 7, 15–19.
- Ku, H.-H. and Sohal, R. S.** (1993). Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. *Mech. Ageing Dev.* 72, 67–76.
- Ku, H.-H., Brunk, U. T. and Sohal, R. S.** (1993). Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 621–627.
- Kuba, K., Zhang, L., Imai, Y., Arab, S., Chen, M., Maekawa, Y., Leschnik, M., Leibbrandt, A., Markovic, M. and Schwaighofer, J.** (2007). Impaired heart contractility in Apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circ. Res.* 101, e32–e42.
- Kujoth, G., Hiona, A., Pugh, T., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S., Hofer, T., Seo, A., Sullivan, R. and Jobling, W.** (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309, 481–484.
- Kwon, S. H., Pimentel, D. R., Remondino, A., Sawyer, D. B. and Colucci, W. S.** (2003). H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 615–621.

L

- Lakatta, E. G.** (1993). Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age. *Physiol. Rev.* 73, 413–467.
- Lakatta, E. G.** (2003). Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises Part III: Cellular and Molecular Clues to Heart and Arterial Aging. *Circ.* 107, 490–497.

- Lakatta, E. G. and Levy, D.** (2003a). Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises Part II: The Aging Heart in Health: Links to Heart Disease. *Circ.* 107, 346–354.
- Lakatta, E. G. and Levy, D.** (2003b). Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises Part I: Aging Arteries: A “Set Up” for Vascular Disease. *Circ.* 107, 139–146.
- Lamb, M. J.** (1964). The effects of radiation on the longevity of female *Drosophila subobscura*. *J. Insect Physiol.* 10, 487–497.
- Lamb, M. J.** (1968). Temperature and Lifespan in *Drosophila*. *Nature* 220, 808–809.
- Laurent, P.** (1962). Contribution à l'étude morphologique et physiologique de l'innervation du coeur des téléostéens. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 51, 337.
- Lawler, D. F., Evans, R. H., Larson, B. T., Spitznagel, E. L., Ellersieck, M. R. and Kealy, R. D.** (2005). Influence of lifetime food restriction on causes, time, and predictors of death in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226, 225–231.
- Lawler, D. F., Larson, B. T., Ballam, J. M., Smith, G. K., Biery, D. N., Evans, R. H., Greeley, E. H., Segre, M., Stowe, H. D. and Kealy, R. D.** (2008). Diet restriction and ageing in the dog: major observations over two decades. *Br. J. Nutr.* 99, 793–805.
- Le Bourg, E.** (1987). Alternation behavior, aging and longevity in *Drosophila melanogaster*: Cross-sectional and longitudinal studies. *Biol. Behav.* 12, 163–174.
- Lefrançois, C. and Claireaux, G.** (2003). Influence of ambient oxygenation and temperature on metabolic scope and scope for heart rate in the common sole *Solea solea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 259, 273–284.
- Lefrançois, C., Shingles, A. and Domenici, P.** (2005). The effect of hypoxia on locomotor performance and behaviour during escape in *Liza aurata*. *J. Fish Biol.* 67, 1711–1729.

- Lesnefsky, E. J., Moghaddas, S., Tandler, B., Kerner, J. and Hoppel, C. L.** (2001). Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Disease: Ischemia–Reperfusion, Aging, and Heart Failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 1065–1089.
- Li, J.-M., Gall, N. P., Grieve, D. J., Chen, M. and Shah, A. M.** (2002). Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertens.* 40, 477–484.
- Liley, N.** (1969). 2 Hormones and Reproductive Behavior in Fishes. *Fish Physiol.* 3, 73–116.
- Lin, A.-L., Zhang, W., Gao, X. and Watts, L.** (2015). Caloric restriction increases ketone bodies metabolism and preserves blood flow in aging brain. *Neurobiol. Ageing* 36, 2296–2303.
- Liu, R. K. and Walford, R. L.** (1966). Increased Growth and Life-span with Lowered Ambient Temperature in the Annual Fish, *Cynolebias adloffi*. *Nature* 212, 1277–1278.
- Liu, R. K. and Walford, R. L.** (1970). Observations on the lifespans of several species of annual fishes and of the world's smallest fishes. *Exp. Gerontol.* 5, 241–246.
- Liu, R. and Walford, R.** (1972). The effect of lowered body temperature on lifespan and immune and non-immune processes. *Gerontol.* 18, 363–388.
- Liu, R. K. and Walford, R. L.** (1975). Mid-Life Temperature-Transfer Effects on Life-Span of Annual Fish. *J. Gerontol.* 30, 129–131.
- Liu, T., Qi, H., Ma, L., Liu, Z., Fu, H., Zhu, W., Song, T., Yang, B. and Li, G.** (2015). Resveratrol Attenuates Oxidative Stress and Extends Life Span in the Annual Fish *Nothobranchius guentheri*. *Rejuvenation Res.* 18, 225–233.
- Lobon-Cervia, J., Utrilla, C., Rincón, P. and Amezcua, F.** (1997). Environmentally induced spatio-temporal variations in the fecundity of brown trout *Salmo trutta* L.: trade-offs between egg size and number. *Freshw. Biol.* 38, 277–288.
- Loeb, J. and Northrop, J. H.** (1917). On the influence of food and temperature upon the “duration of life”.

- Lu, C.-Y. and Hsu, C.-Y.** (2015). Ambient temperature reduction extends lifespan via activating cellular degradation activity in an annual fish (*Nothobranchius rachovii*). *AGE* 37, 1–11.
- Lucas, J., Perrichon, P., Nouhaud, M., Audras, A., Leguen, I. and Lefrancois, C.** (2014a). Aerobic metabolism and cardiac activity in the descendants of zebrafish exposed to pyrolytic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 13888–13897.
- Lucas, J., Schouman, A., Lyphout, L., Cousin, X. and Lefrancois, C.** (2014b). Allometric relationship between body mass and aerobic metabolism in zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Biol.* 84, 1171–1178.
- Lyman, C. P., O'Brien, R. C., Greene, G. C. and Papafrangos, E. D.** (1981). Hibernation and longevity in the Turkish hamster *Mesocricetus brandti*. *Science* 212, 668–670.

M

- Ma, H. and Yang, Y.** (2010). *Turritopsis nutricula*. *Nat. Sci.* 8, 15–20.
- Machida, Y.** (1981). Study of specific dynamic action on some freshwater fishes. *Rep. Usa Mar. Biol. Inst. Kochi Univ.*
- Magalhães, J. P. de and Church, G. M.** (2005). Genomes Optimize Reproduction: Aging as a Consequence of the Developmental Program. *Physiol.* 20, 252–259.
- Mair, W., Goymer, P., Pletcher, S. D. and Partridge, L.** (2003). Demography of Dietary Restriction and Death in *Drosophila*. *Science* 301, 1731–1733.
- Mallekh, R. and Lagardère, J. P.** (2002). Effect of temperature and dissolved oxygen concentration on the metabolic rate of the turbot and the relationship between metabolic scope and feeding demand. *J. Fish Biol.* 60, 1105–1115.
- Mangel, M.** (2001). Complex Adaptive Systems, Aging and Longevity. *J. Theor. Biol.* 213, 559–571.

- Marchi, S., Giorgi, C., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., Missiroli, S., Patergnani, S. and Poletti, F.** (2011). Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J. Signal Transduct.* 2012,.
- Martin, L. B., Scheuerlein, A. and Wikelski, M.** (2003). Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 153–158.
- Masman, D., Dijkstra, C., Daan, S. and Bult, A.** (1989). Energetic limitation of avian parental effort: field experiments in the kestrel (*Falco tinnunculus*). *J. Evol. Biol.* 2, 435–455.
- Masoro, E. J.** (2000). Caloric restriction and aging: an update. *Exp. Gerontol.* 35, 299–305.
- Masoro, E. J.** (2005). Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 126, 913–922.
- Matikainen, N. and Vornanen, M.** (1992). Effect of season and temperature acclimation on the function of crucian carp (*Carassius carassius*) heart. *J. Exp. Biol.* 167, 203–220.
- McCarter, R. J. and Palmer, J.** (1992). Energy metabolism and aging: a lifelong study of Fischer 344 rats. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 263, E448–E452.
- McCay, C. M., Dilley, W. E. and Crowell, M. F.** (1929). Growth Rates of Brook Trout Reared upon Purified Rations, upon Dry Skim Milk Diets, and upon Feed Combinations of Cereal Grains. *J. Nutr.* 1, 233–246.
- McCay, C. M., Crowell, M. F. and Maynard, L.** (1935). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10, 63–79.
- McCue, M. D.** (2006). Specific dynamic action: A century of investigation. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 144, 381–394.
- McKenzie, D. J., Pedersen, P. B. and Jokumsen, A.** (2007). Aspects of respiratory physiology and energetics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) families with different size-at-age and condition factor. *Aquaculture* 263, 280–294.

- Medawar, P. B.** (1952). An unsolved problem of biology. College.
- Meszaros, J., Coutinho, J., Bryant, S., Ryder, K. and Hart, G.** (1997). L-type calcium current in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Exp. Physiol.* 82, 71–83.
- Metcalfe, N. B. and Monaghan, P.** (2003). Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. *Exp. Gerontol.* 38, 935–940.
- Michaelis, M., Johe, K. and Kitos, T.** (1984). Age-dependent alterations in synaptic membrane systems for Ca^{2+} regulation. *Mech. Ageing Dev.* 25, 215–225.
- Milinkovitch, T., Thomas-Guyon, H., Reigner, A., Durollet, M. & Lefrançois, C.** (2015, soumis). Influence of temperature on age-related oxidative stress in a short lived vertebrate (*Nothobranchius furzeri*). *Exp. Gerontol*, soumis.
- Ming, Z., Nordin, C., Siri, F. and Aronson, R. S.** (1994). Reduced calcium current density in single myocytes isolated from hypertrophied failing guinea pig hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26, 1133–1143.
- Minois, N., Khazaeli, A. and Curtsinger, J.** (2001). Locomotor activity as a function of age and life span in *Drosophila melanogaster* overexpressing hsp70. *Exp. Gerontol.* 36, 1137–1153.
- Miquel, J., Lundgren, P. R., Bensch, K. G. and Atlan, H.** (1976). Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* 5, 347–370.
- Mitchell, S. E., Delville, C., Konstantopodos, P., Hurst, J., Deros, D., Green, C., Chen, L., Han, J., Wang, Y. and Promislow, D.** (2015). The effects of graded levels of calorie restriction: II. Impact of short term calorie and protein restriction on circulating hormone levels, glucose homeostasis and oxidative stress in male C57BL/6 mice. *Oncotarget* 5.
- Mohammed, A. H., Henriksson, B. G., Söderström, S., Ebendal, T., Olsson, T. and Seckl, J. R.** (1993). Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav. Brain Res.* 57, 183–191.

Morad, M., Sanders, C. and Weiss, J. (1981). The inotropic actions of adrenaline on frog ventricular muscle: relaxing versus potentiating effects. *J. Physiol.* 311, 585–604.

Morgan, J. B. and York, D. A. (1983). Thermic effect of feeding in relation to energy balance in elderly men. *Ann. Nutr. Metab.* 27, 71–77.

N

Nakaya, H., Takeda, Y., Tohse, N. and Kanno, M. (1992). Mechanism of the membrane depolarization induced by oxidative stress in guinea-pig ventricular cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24, 523–534.

Narayanan, N. (1987). Comparison of ATP-dependent calcium transport and calcium-activated ATPase activities of cardiac sarcoplasmic reticulum and sarcolemma from rats of various ages. *Mech. Ageing Dev.* 38, 127–143.

Naylor, C., Maltby, L. and Calow, P. (1989). Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. In *Environmental Bioassay Techniques and their Application*, pp. 517–523. Springer.

Nilsson, G. E., Rosen, P. and Johansson, D. (1993). Anoxic depression of spontaneous locomotor activity in crucian carp quantified by a computerized imaging technique. *J. Exp. Biol.* 180, 153–162.

Novoseltsev, V. N., Arking, R., Novoseltseva, J. A. and Yashin, A. I. (2002). Evolutionary Optimality Applied to *Drosophila* Experiments: Hypothesis of Constrained Reproductive Efficiency. *Evolution* 56, 1136–1149.

Nuss, H. B. and Houser, S. R. (1991). Voltage dependence of contraction and calcium current in severely hypertrophied feline ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23, 717–726.

Nuss, H. B. and Houser, S. R. (1992). Sodium-calcium exchange-mediated contractions in feline ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 263, H1161–H1169.

O

Olivetti, G., Melissari, M., Capasso, J. M. and Anversa, P. (1991). Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ. Res.* 68, 1560–1568.

Ollivier, H., Marchant, J., Le Bayon, N., Servili, A. and Claireaux, G. (2015). Calcium response of KCl-excited populations of ventricular myocytes from the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a promising approach to integrate cell-to-cell heterogeneity in studying the cellular basis of fish cardiac performance. *J. Comp. Physiol. B* 1–11.

Olsson, M. and Shine, R. (2002). Growth to Death in Lizards. *Evolution* 56, 1867–1870.

P

Pang, X., Cao, Z.-D. and Fu, S.-J. (2011). The effects of temperature on metabolic interaction between digestion and locomotion in juveniles of three cyprinid fish (*Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* and *Spinibarbus sinensis*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 159, 253–260.

Partridge, L. and Farquhar, M. (1981). Sexual activity reduces lifespan of male fruitflies. *Nature* 294, F582.

Partridge, L. and Fowler, K. (1992). Direct and Correlated Responses to Selection on Age at Reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 46, 76–91.

Passos, J. F. and Kirkwood, T. B. (2015). Biological and physiological aspects of aging. *Textb. Geriatr. Dent.* 7.

Pavlov, D. A. and Moksness, E. (1994). Production and quality of eggs obtained from wolffish (*Anarhichas lupus* L.) reared in captivity. *Aquacult.* 122, 295–312.

- Peake, S. J. and Farrell, A. P.** (2004). Locomotory behaviour and post-exercise physiology in relation to swimming speed, gait transition and metabolism in free-swimming smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). *J. Exp. Biol.* 207, 1563–1575.
- Pearl, R.** (1928). *The rate of living*. London University Press. London: London University Press.
- Pechenik, J. A.** (1984). The relationship between temperature, growth rate, and duration of planktonic life for larvae of the gastropod *Crepidula fornicata* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 74, 241–257.
- Pennec, J. and Le Bras, Y.** (1984). Storage and release of catecholamines by nervous endings in the isolated heart of the eel (*Anguilla anguilla* L.). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 77, 167–171.
- Pepe, S., Tsuchiya, N., Lakatta, E. G. and Hansford, R. G.** (1999). PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca^{2+} activation of PDH. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 276, H149–H158.
- Perasalmi, J.** (1997). Effects of temperature acclimation on size, fine structure and myosin composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cardiac myocytes.
- Pérez-Escudero, A., Vicente-Page, J., Hinz, R. C., Arganda, S. and de Polavieja, G. G.** (2014). idTracker: tracking individuals in a group by automatic identification of unmarked animals. *Nat. Methods* 11, 743–8.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e36–e36.
- Phillips, M. C., Moyes, C. D. and Tufts, B. L.** (2000). The effects of cell ageing on metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. *J. Exp. Biol.* 203, 1039–1045.
- Pimentel, D. R., Amin, J. K., Xiao, L., Miller, T., Viereck, J., Oliver-Krasinski, J., Baliga, R., Wang, J., Siwik, D. A. and Singh, K.** (2001). Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 89, 453–460.

- Polačik, M., Donner, M. T. and Reichard, M.** (2011). Age structure of annual *Nothobranchius* fishes in Mozambique: is there a hatching synchrony? *J. Fish Biol.* 78, 796–809.
- Pörtner, H. O.** (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* 88, 137–146.
- Pörtner, H. O.** (2010). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213, 881–893.
- Pörtner, H. O. and Farrell, A. P.** (2008). Ecology: Physiology and Climate Change. *Science* 322, 690–692.
- Poupa, O., Lindström, L., Maresca, A. and Tota, B.** (1981). Cardiac growth, myoglobin, proteins and DNA in developing tuna (*Thunnus thynnus thynnus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 70, 217–222.
- Priede, I. G.** (1977). Natural selection for energetic efficiency and the relationship between activity level and mortality. *Nature* 267, 610–611.
- Priede, I. G.** (1985). Metabolic Scope in Fishes. In *Fish Energetics* (ed. Tytler, P. and Calow, P.), pp. 33–64. Springer Netherlands.
- Promislow, D. E. L. and Haselkorn, T. S.** (2002). Age-specific metabolic rates and mortality rates in the genus *Drosophila*. *Aging Cell* 1, 66–74.

R

- Ragland, S. S. and Sohal, R. S.** (1975). Ambient temperature, physical activity and aging in the housefly, *Musca domestica*. *Exp. Gerontol.* 10, 279–289.
- Rakusan, K.** (1984). Cardiac growth, maturation and aging. In *Growth of the Heart in Health and Disease*, pp. 131–164. Raven Press New York.

- Reid, S. G., Bernier, N. J. and Perry, S. F.** (1998). The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 120, 1–27.
- Reidy, S., Nelson, J., Tang, Y. and Kerr, S.** (1995). Post-exercise metabolic rate in Atlantic cod and its dependence upon the method of exhaustion. *J. Fish Biol.* 47, 377–386.
- Reidy, S. P., Kerr, S. R. and Nelson, J. A.** (2000). Aerobic and anaerobic swimming performance of individual Atlantic cod. *J. Exp. Biol.* 203, 347–357.
- Ren, C., Williams, G. M., Mengersen, K., Morawska, L. and Tong, S.** (2009). Temperature enhanced effects of ozone on cardiovascular mortality in 95 large US communities, 1987–2000: assessment using the NMMAPS data. *Arch. Environ. Occup. Health* 64, 177–184.
- Ren, C., O'Neill, M. S., Park, S. K., Sparrow, D., Vokonas, P. and Schwartz, J.** (2011). Ambient temperature, air pollution, and heart rate variability in an aging population. *Am. J. Epidemiol.* 173, 1013–1021.
- Rera, M., Bahadorani, S., Cho, J., Koehler, C. L., Ulgherait, M., Hur, J. H., Ansari, W. S., Lo, T., Jones, D. L. and Walker, D. W.** (2011). Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog. *Cell Metab.* 14, 623–634.
- Rera, M., Clark, R. I. and Walker, D. W.** (2012). Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 21528–21533.
- Reynolds, W. W. and Casterlin, M. E.** (1979). Behavioral Thermoregulation and the “Final Preferendum” Paradigm. *Am. Zool.* 19, 211–224.
- Reznick, D., Bryant, M. and Holmes, D.** (2005). The Evolution of Senescence and Post-Reproductive Lifespan in Guppies (*Poecilia reticulata*). *PLoS Biol* 4, e7.
- Rimbaud, S., Garnier, A. and Ventura-Clapier, R.** (2009). Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacol. Rep.* 61, 131–138.
- Robertson, R., Meagor, J. and Taylor, E.** (2002). Specific dynamic action in the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), in relation to acclimation temperature and to the onset of the emersion response. *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 350–359.

Roff, D. (2001). Age and size at maturity.

Rollo, C. D. (2002). Growth negatively impacts the life span of mammals. *Evol. Dev.* 4, 55–61.

Rønning, B., Moe, B., Berntsen, H. H., Noreen, E. and Bech, C. (2014). Is the Rate of Metabolic Ageing and Survival Determined by Basal Metabolic Rate in the Zebra Finch? *PLoS ONE* 9, e108675.

Rose, M. R. and Charlesworth, B. (1981). Genetics of Life History in *Drosophila Melanogaster*. I. Sib Analysis of Adult Females. *Genetics* 97, 173–186.

Roth, G. S. and Ingram, D. K. (2015). Calorie Restriction Mimetics: Progress and Potential. In *Nutrition, Exercise and Epigenetics: Ageing Interventions* (ed. Yu, B. P.), pp. 211–243. Springer International Publishing.

Rozenzweig, R., Grad, B. R. and Ochoa, J. (1987). The role of melatonin and serotonin in aging. *Med. Hypotheses* 23, 337–352.

Rubner, M. (1908). Das problem des lebensdauer und zeine beziehungen zum wachstum und ernährung. Oldenbourg. Munich: Oldenbourg.

Rudolph, A. M. (1979). Fetal and neonatal pulmonary circulation. *Annu. Rev. Physiol.* 41, 383–395.

S

Saito, A. (1969). Electrophysiological studies on the pacemaker of several fish hearts. *Zool Mag* 78, 291–296.

Saito, T. (1973). Effects of vagal stimulation on the pacemaker action potentials of carp heart. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 44, 191–199.

Santer, R. M. (1974). The organization of the sarcoplasmic reticulum in teleost ventricular myocardial cells. *Cell Tissue Res.* 151, 395–402.

- Santer, R. M.** (1985). Morphology and innervation of the fish heart. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 89, 1–102.
- Satchell, G. H.** (1991). Physiology and form of fish circulation. Cambridge University Press.
- Sawyer, D. B., Siwik, D. A., Xiao, L., Pimentel, D. R., Singh, K. & Colucci, W. S.** (2002). Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 379–388.
- Schurmann, H. and Steffensen, J. F.** (1997). Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod. *J. Fish Biol.* 50, 1166–1180.
- Scimonelli, T., Marucco, M. and Celis, M.** (1999). Age-related changes in grooming behavior and motor activity in female rats. *Physiol. Behav.* 66, 481–484.
- Secor, S. M.** (2008). Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. *J. Comp. Physiol. B* 179, 1–56.
- Secor, S. M., Wooten, J. A. and Cox, C. L.** (2007). Effects of meal size, meal type, and body temperature on the specific dynamic action of anurans. *J. Comp. Physiol. B* 177, 165–182.
- Selman, C., Blount, J. D., Nussey, D. H. and Speakman, J. R.** (2012). Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends Ecol. Evol.* 27, 570–577.
- Sgrò, C. M. and Partridge, L.** (1999). A Delayed Wave of Death from Reproduction in *Drosophila*. *Science* 286, 2521–2524.
- Shiels, H. A., Freund, E. V., Farrell, A. P. and Block, B. A.** (1999). The sarcoplasmic reticulum plays a major role in isometric contraction in atrial muscle of yellowfin tuna. *J. Exp. Biol.* 202, 881–890.
- Shiels, H. A., Vornanen, M. and Farrell, A. P.** (2002a). Effects of temperature on intracellular $[Ca^{2+}]$ in trout atrial myocytes. *J. Exp. Biol.* 205, 3641–3650.

- Shiels, H. A., Vornanen, M. and Farrell, A. P.** (2002b). Temperature dependence of cardiac sarcoplasmic reticulum function in rainbow trout myocytes. *J. Exp. Biol.* 205, 3631–3639.
- Siwak, C. T., Murphey, H. L., Muggenburg, B. A. and Milgram, N. W.** (2002). Age-dependent decline in locomotor activity in dogs is environment specific. *Physiol. Behav.* 75, 65–70.
- Smith, R.** (1969). Control of prespawning behaviour of sunfish (*Lepomis gibbosus* and *L. megalotis*). I. Gonadal androgen. *Anim. Behav.* 17, 279–285.
- Smith, E. E., Guyton, A. C., Manning, R. D. and White, R. J.** (1976). Integrated mechanisms of cardiovascular response and control during exercise in the normal human. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 18, 421–443.
- Sohal, R. S.** (1986). The Rate of Living Theory: A Contemporary Interpretation. In *Insect Aging* (ed. Collatz, P. D. K.-G. and Sohal, P. D. R. S.), pp. 23–44. Springer Berlin Heidelberg.
- Sohal, R. S.** (2002). Oxidative stress hypothesis of aging 1, 2. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 573–574.
- Sohal, R. S. and Allen, R. G.** (1986). Relationship between oxygen metabolism, aging and development. *Adv. Free Radic. Biol. Med.* 2, 117–160.
- Sohal, R. S. and Buchan, P. B.** (1981). Relationship between physical activity and life span in the adult housefly, *Musca domestica*. *Exp. Gerontol.* 16, 157–162.
- Sohal, R. S. and Weindruch, R.** (1996). Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science* 273, 59–63.
- Sohal, R. S., Toy, P. L. and Farmer, K. J.** (1987). Age-related changes in the redox status of the housefly, *Musca domestica*. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 6, 95–100.
- Sohal, R. S., Mockett, R. J. and Orr, W. C.** (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis 1,2. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 575–586.

- Sokolova, I. M. and Pörtner, H. O.** (2003). Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. *J. Exp. Biol.* 206, 195–207.
- Soofiani, N. and Hawkins, A.** (1982). Energetic costs at different levels of feeding in juvenile cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish Biol.* 21, 577–592.
- Soofiani, N. M. and Priede, I. G.** (1985). Aerobic metabolic scope and swimming performance in juvenile cod, *Gadus morhua* L. *J. Fish Biol.* 26, 127–138.
- Speakman, J. R.** (2003). Oxidative phosphorylation, mitochondrial proton cycling, free-radical production and aging. In *Advances in Cell Aging and Gerontology* (ed. Mattson, M. P.), pp. 35–68. Elsevier.
- Speakman, J. R.** (2005). Body size, energy metabolism and lifespan. *J. Exp. Biol.* 208, 1717–1730.
- Speakman, J. R. and Mitchell, S. E.** (2011). Caloric restriction. *Mol. Aspects Med.* 32, 159–221.
- Speakman, J. R., Selman, C., McLaren, J. S. and Harper, E. J.** (2002). Living Fast, Dying When? The Link between Aging and Energetics. *J. Nutr.* 132, 1583S–1597S.
- Speakman, J. R., Talbot, D. A., Selman, C., Snart, S., McLaren, J. S., Redman, P., Krol, E., Jackson, D. M., Johnson, M. S. and Brand, M. D.** (2004). Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell* 3, 87–95.
- Spencer, C. C., Howell, C. E., Wright, A. R. and Promislow, D. E. L.** (2003). Testing an “aging gene” in long-lived *Drosophila* strains: increased longevity depends on sex and genetic background. *Aging Cell* 2, 123–130.
- Stacey, N. and Kyle, A. L.** (1983). Effects of olfactory tract lesions on sexual and feeding behavior in the goldfish. *Physiol. Behav.* 30, 621–628.
- Steffensen, J. F.** (1989). Some errors in respirometry of aquatic breathers: How to avoid and correct for them. *Fish Physiol. Biochem.* 6, 49–59.

- Steffensen, J. F., Bushnell, P. G. and Schurmann, H.** (1994). Oxygen consumption in four species of teleosts from Greenland: no evidence of metabolic cold adaptation. *Polar Biol.* 14, 49–54.
- Stockley, P., Gage, M., Parker, G. and Møller, A.** (1997). Sperm competition in fishes: the evolution of testis size and ejaculate characteristics. *Am. Nat.* 149, 933–954.
- Strait, J. B. and Lakatta, E. G.** (2012). Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail. Clin.* 8, 143–164.
- Suh, J. H., Heath, S.-H. and Hagen, T. M.** (2003). Two subpopulations of mitochondria in the aging rat heart display heterogenous levels of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1064–1072.
- Sujkowski, A. and Wessells, R.** (2015). *Drosophila* Models of Cardiac Aging and Disease. In *Life Extension* (ed. Vaiserman, A. M., Moskalev, A. A., and Pasyukova, E. G.), pp. 127–150. Springer International Publishing.

T

- Tandler, A. and Beamish, F.** (1979). Mechanical and biochemical components of apparent specific dynamic action in largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacépède. *J. Fish Biol.* 14, 343–350.
- Tateda, Y., Sakaguchi, I. and Itani, G.** (2015). Scope for growth of *Mytilus galloprovincialis* and *Perna viridis* as a thermal stress index in the coastal waters of Japan: Field studies at the Uranouchi inlet and Yokohama. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 470, 55–63.
- Taylor, J. C. and Miller, J. M.** (2001). Physiological performance of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma* (Jordan and Gilbert, 1884), in chronic and episodic hypoxia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 258, 195–214.
- Taylor, D. S., Turner, B. J., Davis, W. P. and Chapman, B. B.** (2008). A novel terrestrial fish habitat inside emergent logs. *Am. Nat.* 171, 263–266.

- Terzibasi, E., Valenzano, D. R. and Cellerino, A.** (2007). The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. *Exp. Gerontol.* 42, 81–89.
- Terzibasi, E., Valenzano, D. R., Benedetti, M., Roncaglia, P., Cattaneo, A., Domenici, L. and Cellerino, A.** (2008). Large Differences in Aging Phenotype between Strains of the Short-Lived Annual Fish *Nothobranchius furzeri*. *PLoS ONE* 3, e3866.
- Terzibasi, E., Lefrançois, C., Domenici, P., Hartmann, N., Graf, M. and Cellerino, A.** (2009). Effects of dietary restriction on mortality and age-related phenotypes in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell* 8, 88–99.
- Thomas, M. J., Hamman, B. N. and Tibbits, G. F.** (1996). Dihydropyridine and ryanodine binding in ventricles from rat, trout, dogfish and hagfish. *J. Exp. Biol.* 199, 1999–2009.
- Thorarensen, H. and Farrell, A. P.** (2006). Postprandial intestinal blood flow, metabolic rates, and exercise in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 688–694.
- Thörne, A. and Wahren, J.** (1990). Diminished meal-induced thermogenesis in elderly man. *Clin. Physiol.* 10, 427–437.
- Tibbits, G. F., Hove-Madsen, L. and Bers, D. M.** (1991). Calcium transport and the regulation of cardiac contractility in teleosts: a comparison with higher vertebrates. *Can. J. Zool.* 69, 2014–2019.
- Tibbits, G. F., Philipson, K. D. and Kashihara, H.** (1992). Characterization of myocardial Na^+ - Ca^{2+} exchange in rainbow trout. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 262, C411–C417.
- Tirsgaard, B., Behrens, J. W. and Steffensen, J. F.** (2015). The effect of temperature and body size on metabolic scope of activity in juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 179, 89–94.
- Tiitu, V. and Vornanen, M.** (2002). Morphology and fine structure of the heart of the burbot, a cold stenothermal fish. *J. Fish Biol.* 61, 106–121.

Tomm, R. J., Ma, C. Q., Maric, T. T., Grist, M. M., Low, K. L., Tobiansky, D. J., Floresco, S. B. and Soma, K. K. (2015). LBF-088: Effects of Aging on Cognition, Mesocorticolimbic Dopamine System, and Testosterone in Male Rats.

Torella, D., Rota, M., Nurzynska, D., Musso, E., Monsen, A., Shiraishi, I., Zias, E., Walsh, K., Rosenzweig, A., Sussman, M. A., Urbanek, K., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Anversa, P., Leri, A. (2004). Cardiac Stem Cell and Myocyte Aging, Heart Failure, and Insulin-Like Growth Factor-1 Overexpression. *Circ. Res.* 94, 514–524.

V

Vagner, M., Zambonino-Infante, J.-L., Mazurais, D., Imbert-Auvray, N., Ouillon, N., Dubillot, E., Delliou, H. L., Akbar, D. and Lefrançois, C. (2014). Reduced n-3 highly unsaturated fatty acids dietary content expected with global change reduces the metabolic capacity of the golden grey mullet. *Mar. Biol.* 161, 2547–2562.

Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L. and Cellerino, A. (2006a). Resveratrol Prolongs Lifespan and Retards the Onset of Age-Related Markers in a Short-Lived Vertebrate. *Curr. Biol.* 16, 296–300.

Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Cattaneo, A., Domenici, L. and Cellerino, A. (2006b). Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell* 5, 275–278.

Van der Veer, H. W., Cardoso, J. F. M. F., Peck, M. A. and Kooijman, S. A. L. M. (2009). Physiological performance of plaice *Pleuronectes platessa* (L.): A comparison of static and dynamic energy budgets. *J. Sea Res.* 62, 83–92.

Ventura-Clapier, R., Garnier, A. and Veksler, V. (2008). Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovasc. Res.* 79, 208–217.

Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V. and Joubert, F. (2011). Bioenergetics of the failing heart. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* 1813, 1360–1372.

- Voorhies, W. A. V., Khazaeli, A. A. and Curtsinger, J. W.** (2003). Selected Contribution: Long-lived *Drosophila melanogaster* lines exhibit normal metabolic rates. *J. Appl. Physiol.* 95, 2605–2613.
- Vornanen, M.** (1997). Sarcolemmal Ca influx through L-type Ca channels in ventricular myocytes of a teleost fish. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 272, R1432–R1440.
- Vornanen, M.** (1998). L-type Ca^{2+} current in fish cardiac myocytes: effects of thermal acclimation and beta-adrenergic stimulation. *J. Exp. Biol.* 201, 533–547.
- Vornanen, M.** (1999). $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange current in ventricular myocytes of fish heart: contribution to sarcolemmal Ca^{2+} influx. *J. Exp. Biol.* 202, 1763–1775.
- Vornanen, M., Shiels, H. A. and Farrell, A. P.** (2002). Plasticity of excitation–contraction coupling in fish cardiac myocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 132, 827–846.
- Vrtilek, M. and Reichard, M.** (2014). Highly plastic resource allocation to growth and reproduction in females of an African annual fish. *Ecol. Freshw. Fish.*

W

- Wang, T., Zaar, M., Arvedsen, S., Vedel-Smith, C. and Overgaard, J.** (2002). Effects of temperature on the metabolic response to feeding in *Python molurus*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 133, 519–527.
- Watanabe, T., Arakawa, T., Kitajima, C. and Fujita, S.** (1984). Effect of Nutritional Quality of Broodstock Diets on Reproduction of Red Sea Bream. *Nippon Suisan Gakkaishi* 50, 495–501.
- Weindruch, R. and Sohal, R. S.** (1997). Caloric Intake and Aging. *N. Engl. J. Med.* 337, 986–994.
- Weinert, B. T. and Timiras, P. S.** (2003). Invited Review: Theories of aging. *J. Appl. Physiol.* 95, 1706–1716.

- Weismann, A.** (1889). The significance of sexual reproduction in the theory of natural selection. *Essays Hered. Kindred Biol. Probl.* 1, 255–332.
- Wickenden, A. D., Kaprielian, R., Kassiri, Z., Tsoporis, J. N., Tsushima, R., Fishman, G. I. and Backx, P. H.** (1998). The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure. *Cardiovasc. Res.* 37, 312–323.
- Wieser, W.** (1985). Developmental and Metabolic Constraints of the Scope for Activity in Young Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri*). *J. Exp. Biol.* 118, 133–142.
- Williams, G. C.** (2001). Pleiotropy, Natural Selection, and the Evolution of Senescence. *Sci. Aging Knowl. Environ.* 2001, cp13.
- Wittköpper, K., Fabritz, L., Neef, S., Ort, K. R., Grefe, C., Unsöld, B., Kirchhof, P., Maier, L. S., Hasenfuss, G. and Dobrev, D.** (2010). Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging. *J. Clin. Invest.* 120, 617.
- Wood, C. M. and McDonald, D. G.** (1997). *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish.* Cambridge University Press.
- Woodhead, A.** (1984). Aging changes in the heart of a poeciliid fish, the guppy *Poecilia reticulatus*. *Exp. Gerontol.* 19, 383–391.
- Woodhead, A., Pond, V. and Dailey, K.** (1983). Aging changes in the kidneys of two poeciliid fishes, the guppy *Poecilia reticulatus* and the Amazon molly *P. formosa*. *Exp. Gerontol.* 18, 211–221.

X

- Xie, S., Cui, Y., Yang, Y. and Liu, J.** (1997). Energy budget of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in relation to ration size. *Aquacult.* 154, 57–68.

Y

Yamazaki, T., Tobe, K., Hoh, E., Maemura, K., Kaida, T., Komuro, I., Tamemoto, H., Kadowaki, T., Nagai, R. and Yazaki, Y. (1993). Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 268, 12069–12076.

Yue, D. T. (1987). Intracellular $[Ca^{2+}]$ related to rate of force development in twitch contraction of heart. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 252, H760–H770.

Z

Zaza, A., Robinson, R. B. and DiFrancesco, D. (1996). Basal responses of the L-type Ca^{2+} and hyperpolarization-activated currents to autonomic agonists in the rabbit sino-atrial node. *J. Physiol.* 491, 347–355.

Zhdanova, I., Yu, L., Lopez-Patino, M., Shang, E., Kishi, S. and Guelin, E. (2008). Aging of the circadian system in zebrafish and the effects of melatonin on sleep and cognitive performance. *Brain Res. Bull.* 75, 433–441.

Zhu, X., Altschaf, B. A., Hajjar, R. J., Valdivia, H. H. and Schmidt, U. (2005). Altered Ca^{2+} sparks and gating properties of ryanodine receptors in aging cardiomyocytes. *Cell Calcium* 37, 583–591.

ANNEXES

Annexe 1 : Article soumis dans « **Experimental gerontology** »

Influence of temperature on age-related oxidative stress in a short
lived vertebrate (*Nothobranchius furzeri*)

Thomas Milinkovitch^{1,2*}, Christel Lefrançois^{1‡}, Anaïs Reigner¹, Marie Durollet¹, Hélène
Thomas-Guyon^{1‡}

Affiliations

¹Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266, CNRS-Université de La Rochelle,
2 rue Olympe de Gouges, F-17042 La Rochelle Cedex 01, France.

Email: t.milinkovitch@hotmail.fr; helene.thomas@univ-lr.fr; reigner.anais@orange.fr;
marie.durollet@univ-lr.fr; clefranc@univ-lr.fr

²IAMC-CNR, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero, Consiglio Nazionale
delle Ricerche, Località Sa Mardini, 09170, Torregrande, Oristano, Italy.

* **Corresponding author:** IAMC-CNR, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero,
Consiglio Nazionale delle Ricerche, Località Sa Mardini,
09170, Torregrande, Oristano, Italy.

Email: t.milinkovitch@hotmail.fr

‡ These authors contributed equally to this manuscript.

Key words: Aging, Temperature, Oxidative stress, Malondialdehyde, *Nothobranchius furzeri*,
vertebrates

Abstract

In ectotherms, temperature modulates oxidative stress which is a key driver of aging. Consequently, in order to improve the comprehension of aging, this study investigated the influence of temperature on oxidative stress at several phases of ectotherms' life. We conducted a longitudinal approach in a short lived killifish, *Nothobranchius furzeri*. Malondialdehyde contents were assessed, at three life stages, in liver and muscle of fish acclimatized to optimal or sub-optimal temperatures during all their life cycle. Our results highlighted an oxidative stress increase in senescent organisms. In the liver, this increase was more intense in senescent fish acclimatized to sub-optimal temperature.

In the mid-50's, the "free radical theory" stated that radical oxygen species generated in cells result in damages leading to age-related decline in biological functions (Harnam, 1956). Although further research highlighted that ageing is a multifactorial process, oxidative stress is still claimed as a key factor of senescence (Preedy, 2014). While genetic determinism partly explained the age-related oxidative stress, studies also showed the implication of environmental insults (reviewed in Finkel and Holbrook, 2000). On this topic, the influence of caloric restriction has been intensively regarded (e.g. Sohal and Weindruch, 1996; Mattison et al., 2012). Conversely, although temperature modulates oxidative stress in ectotherms (reviewed in Lushchak et al., 2011), few studies considered the influence of this factor on age-related oxidative stress (Malek et al., 2004; Valenzano et al., 2006; Hemmer Brepson et al., 2014). Moreover, these studies investigated the influence of temperature on oxidative stress with a single measurement point in adult or senescent ectotherms; no longitudinal approaches (*i.e.* considering oxidative stress at several phases of ectotherms' life) were

conducted. Consequently, this preliminary study explores a new avenue for aging research by investigating the influence of temperature upon oxidative stress at different life phases of a vertebrate ectotherm. The chosen species was the short-lived killifish *Nothobranchius furzeri*, considering its suitability as a model species for aging studies (Cellerino et al., 2015). The age-related oxidative stress was estimated in liver and muscle for two temperatures: 26°C, considered as the optimal temperature for the fish since it induces the higher growth rate (Genade et al., 2005); 22°C, considered as the sub-optimal temperature.

During experiment, life cycle of *N. furzeri* (strain MZM 0410, Terzibasi et al., 2008) was entirely controlled. From hatching to 10 days post-hatching (dph), juveniles were fed twice a day with *nauplii* of *Artemia salina* and water (24°C) was daily renewed. At 10 days dph, individuals were transferred in rearing tanks and acclimatized at 22.1 ± 0.8 °C or 25.6 ± 0.5 °C. In rearing tanks (0.50 x 0.30 x 0.25 m), fish were fed twice a day *ad libitum* with *Chironomus larvae* and exposed to artificial light period of 12 hours per day. Seven fish were euthanized (using 0.008% eugenol) after 7 weeks (juvenile), 18 weeks (adult) and 30 weeks (senescent) post hatching for each temperature of acclimatization. Liver and axial muscle were removed and stored at -80°C. Then, these tissues were homogenised in ice-cold phosphate buffer containing Halt protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific). The homogenates were centrifuged at 12500 g at 4 °C for 15 min and the post-mitochondrial fractions (PMF) were used for assays. Total protein concentrations were determined using the method of Bradford (1976). Then, lipid peroxidation was evaluated via malondialdehyde (MDA) concentration using a commercially available MDA assay kit (Oxis International). The results are presented in µmol of MDA/g of protein and significant difference between the two temperatures and between the three ages were highlighted using non parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests, respectively. A correction of Bonferonni was applied and consequently differences were considered significant if $P < 0.01$.

Regarding the effect of age on lipid peroxidation, our results showed higher hepatic MDA levels (**Figure 1A**) in juveniles than in adult fish for both temperatures of acclimatization. Such a finding highlights the oxidative stress during the early phase of the fish life. This agrees with the hypothesis of a developmental-phase related oxidative stress (stated by Monaghan et al., 2009). This hypothesis suggests a link between the high metabolic activities for growth and ROS generation. Regarding the lifecycle of our model species, such a hypothesis is even more postulatable. Indeed, Terzibasi et al. (2007) described the lifecycle of *N. furzeri* as “tied with explosive growth and accelerated with sexual maturation”. Considering the fact that the liver is a highly irrigated organ involved in nutrient synthesis and storage, the metabolic demand of this organ during development may have been intense and consequently have induced a particularly elevated oxidative stress. Looking at both organs (**Figure 1A and 1B**), our results highlighted an increase of MDA in senescent organisms (30 weeks), when compared to the adult phase (18 weeks). Such a pattern, obtained in both tissues, is in line with the “free-radical theory” of aging (Harnam, 1956) and more particularly with a recent study conducted by Hsu et al. (2008) who observed an increase of oxidative stress linked with a decrease of antioxidant systems response in aged *Nothobranchius rachovii*.

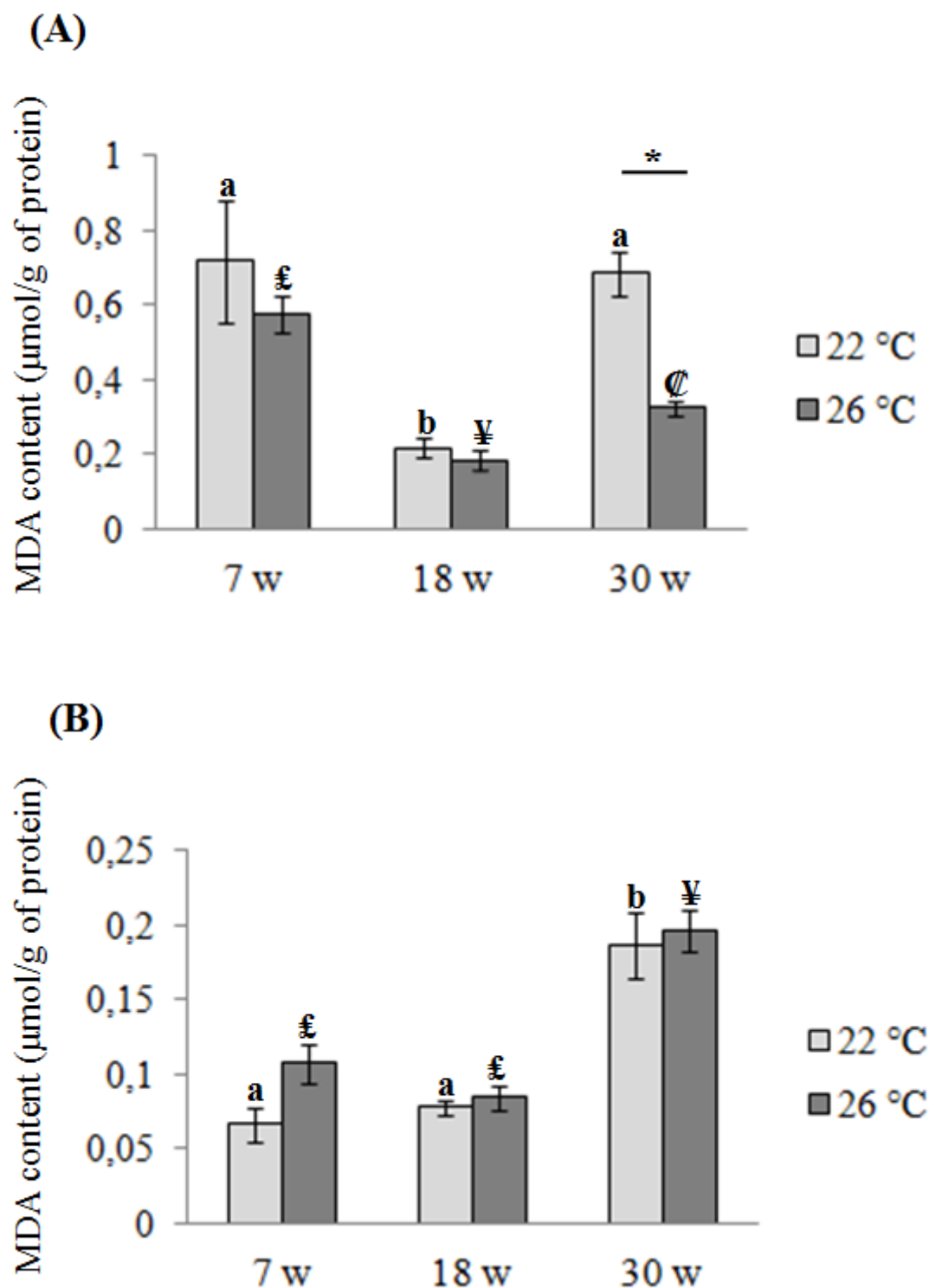


Figure 1: MDA contents in the liver (A) and in the muscle (B) of *Nothobranchius furzeri* exposed to 22°C (grey) and 26°C (dark grey) during 7, 18 and 30 weeks (7 w, 18 w and 30 w). Values represent mean \pm standard error (n=7). For fish exposed to 22 °C, *different letters* above bars (a, b and c) indicate a *significant difference* ($P < 0.01$) between the several age. For fish exposed to 26 °C, *different symbols* above bars (£, ¥ and ℥) indicate a *significant difference* ($P < 0.01$) between the several age. *indicates a significant difference between same-age fish exposed to 22 and 26 °C

Regarding the effects of temperature, results did not fit with our expectations. Indeed, it is generally admitted that (i) a higher acclimatization temperature in ectotherm vertebrates induces higher metabolic rates (up to a limit of temperature above the optimal one, Portner and Farrell, 2008) and (ii) metabolic activity is responsible for the production of free-radicals (Turrens, 1997). Base on these two statements, we expected that the higher acclimatization temperature of this study (26°C) would have led to a higher oxidative stress (hypothesis of a temperature-dependant oxidative stress mediated through the variation of metabolic rate). However, in our study, this phenomenon was not observed in the muscle (no significant difference of oxidative stress between 26°C and 22°C acclimatized fish) and was opposite to our expectations in the liver of senescent fish (the highest acclimatization temperature, *i.e.* 26°C, led to the lowest oxidative stress). Thus, our results, in accordance with other studies (Malek et al., 2004; Hemmer Brepson et al., 2014), showed that a higher acclimatization temperature might not lead to a higher oxidative stress. This disagrees with the hypothesis of a temperature-dependant oxidative stress mediated through the variation of metabolic rates.

To explain the higher oxidative stress in the liver of senescent fish acclimatized to 22°C, we considered that decreasing efficiency of the antioxidant systems may be responsible for oxidative stress in senescent killifish (in accordance with Hsu et al., 2008). We postulated that this decrease was more important in fish acclimatized to sub-optimal temperature than in fish acclimatized to their optimal temperature.

A study conducted by Valenzano et al. (2006) showed that *N. furzeri* acclimatized to 22°C exposed significantly longer life span than fish acclimatized to 26°C. Surprisingly, although cold temperature acclimatization induces longer lifespan, it also led, in our study, to a higher oxidative stress in the liver. Such a discrepancy could suggest that the prolongation of lifespan due to cold temperature is not mediated through a reduction of the oxidative stress.

In conclusion, this first longitudinal approach developed in this study gives a novel insight on the influence of temperature upon the age-related oxidative stress in ectotherms. The increase of oxidative stress with aging in the two target tissues conforms to the “free radical theory” of aging. The high level of lipid peroxidation in the liver of juveniles is in line with the hypothesis of a developmental-phase related oxidative stress. Finally, results expose a higher oxidative stress in the liver of senescent fish acclimatized to sub-optimal temperature than in those acclimatized to optimal temperature. This finding disagrees with the ideas that (i) the variation of oxidative stress due to acclimatization temperature is mediated via the metabolic rate; (ii) the prolongation of lifespan due to cold temperature is mediated through a reduction of oxidative stress. However such conclusions should be cautious since further studies are required to give a comprehensive framework for understanding the influence of temperature on age-related oxidative stress. Indeed, longitudinal approaches should be conducted in several ectotherms by using different indicators of oxidative stress (e.g. DNA damages, protein oxidation) in target organs.

Acknowledgment

Postdoctoral fellow, mobility grants and experimentation costs for this work were supported by the project ALIVE (Ageing and functional integrity: modulation by LIfe-extending treatments in a VERtebrate model with extremely short lifespan) funded by Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-JCJC-1711). The study has been partially funded through the grant from Ambassade de Norvège.

References

Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic. Biochem.* **72**, 248-254.

Cellerino A, Valenzano DR, Reichard M (2015) From the bush to the bench: the annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology. *Biological Reviews*. DOI: 10.1111/brv.12183

Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247.

Genade T, Benedetti M, Terzibasi E, Roncaglia P, Valenzano DR (2005) Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. *Aging Cell.* 4, 223–233

Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan J, Chaudière J (1998) Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1176-1183.

Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298-300.

Hemmer-Brepson C, Replumaz L, Romestaing C, Voituron Y, Daufresne M (2014) Non-stressful temperature effect on oxidative balance and life history traits in adult fish (*Oryzias latipes*). *J. Exp. Biol.* **217**, 274-282

Hsu CY, Chiu YC, Hsu WL, Chan YP (2008) Age-Related Markers Assayed at Different Developmental Stages of the Annual Fish *Nothobranchius rachovii*. *J. Gerontol.* **12**, 1267-1276.

Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicol.* **101**, 13-30

Malek RL, Sajadi H, Abraham J, Grundy MA, Gerhard GS (2004) The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* **138**, 363–373.

Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, De Cabo R (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature.* **489**, 318-322.

Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R (2009) Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Letters.* **12**, 75–92.

Pörtner HO, Farrell AP (2008) Ecology: Physiology and Climate Change. *Science* **322**, 690–692.

Preedy VR (2014) Aging: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. Oxford: Academic press, Elsevier publishing company

Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science.* **273**, 59-63.

Terzibasi E, Valenzano DR, Cellerino A (2007) The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. *Exp. Gerontol.* **42**, 81–89

Terzibasi E, Valenzano DR, Benedetti M, Roncaglia P, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A (2008) Large differences in aging phenotype between strains of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*. *PLoS ONE.* **3**, 38-66

Turrens JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep.* **17**, 3-8

Valenzano DR, Terzibasi E, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A (2006) Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell.* **5**, 275-278

Régulation de la fonction cardio-respiratoire au cours du cycle de vie de *Nothobranchius furzeri* : rôle de la température

Résumé :

Le système cardio-respiratoire joue un rôle prépondérant au sein d'un organisme, en permettant notamment l'apport et la distribution du dioxygène et des nutriments à l'ensemble des cellules. Mieux comprendre les modifications du système cardio-respiratoire au cours de la vie est donc un élément central dans l'évaluation de la capacité de l'organisme à répondre à ses différents besoins énergétiques, ainsi que dans la compréhension du phénomène de mortalité naturelle liée à la sénescence. Cette étude a été réalisée sur un vertébré à durée de vie extrêmement courte (~6 mois), le poisson *Nothobranchius furzeri*. La température, en plus d'être considérée comme l'un des principaux facteurs environnementaux susceptible d'influencer la physiologie des téléostéens, est connue pour son effet régulateur sur la longévité. Ainsi, les individus étaient acclimatés à deux températures, 26 °C considérée comme la température optimale chez cette espèce, et une température réduite de 22 °C. Au niveau individuel, les réponses biologiques ont été explorées au travers des performances physiologiques comme mesure indirecte de la fitness : la capacité métabolique aérobie (AS), la croissance, les performances de reproduction, de locomotion et de digestion. A l'échelle sub-individuelle, les mécanismes de régulation de la fonction cardiaque ont été examinés via une étude morpho-fonctionnelle des cardiomyocytes. Les résultats mettent en évidence la présence au cours de la vie de deux phases bien distinctes délimitées par un âge optimal : (1) une première phase d'élévation de l'AS des stades juvénile à adultes ; suivie (2) d'une seconde phase, synonyme de déclin de l'AS, des indicateurs cardiaques et des niveaux d'activités ciblées, associés probablement à l'entrée en sénescence. Une réduction de température accroît la longévité, et retarde les effets néfastes du vieillissement sur l'AS, et les performances cardiaques. Cette étude contribuera à établir une vision globale des effets du vieillissement sur la fonction cardio-respiratoire et à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors d'un allongement de la longévité par une réduction de la température.

Mots clés : capacité métabolique aérobie, SDA, locomotion, reproduction, performances cardiaque, flux de calcium, sénescence, temperature, *Nothobranchius furzeri*

Cardio-respiratory function during *Nothobranchius furzeri* life cycle: temperature impact

abstract :

Cardio-respiratory system plays a key role in an organism by delivering oxygen and nutrients towards the cells. Exploring its age-dependant changes is therefore a corner stone for assessing the organism capacity to meet its energetic needs along its life cycle, and for the understanding of mechanisms involved in the mortality due to aging process. This study was realized in a vertebrate with an extremely short lifespan (~6 months), the fish *Nothobranchius furzeri*. Temperature is an external factor that regulates longevity. Here, fish were acclimatized at two temperatures, 26 °C considered as the optimal temperature for this species, and 22 °C. Biological responses of fish were evaluated at individual level through the assessment of aerobic metabolic scope (AS), growth, reproduction, locomotion and digestion, which are considered to be relevant indirect measurement of fitness. Furthermore, mechanisms involved in the cardiac function regulation were explored through a morpho-functional study of cardiomyocytes. Along the individual life cycle, two phases were emphasized: 1) the first corresponds to AS elevation from the juvenile to the adult stages, following by 2) a second phase reflecting the entrance in the senescent stage, characterized by the decline in AS, cardiac performances and in activity level. A temperature reduction increases the individual longevity and slows-down deleterious effect of aging on both AS and cardiac function. This study will contribute to provide a global vision of senescent effects on cardio-respiratory system, and a better understanding of the mechanisms involved in temperature-dependent increase in longevity.

Keywords : aerobic metabolic scope, SDA, locomotion, reproduction, cardiac performances, calcium handling, aging process, *Nothobranchius furzeri*, temperature.



Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés

2 rue Olympe de Gouges
17000 LA ROCHELLE CEDEX 1

